



Sara Cristina Jesus Silva

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Henrique Luís Lopes Ferreira Reguengo da Luz e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sara Cristina Jesus Silva

# Relatório de Estágio

## Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Henrique Luís  
Lopes Ferreira Reguengo da Luz e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

# Índice

Índice de Imagens .....	V
Índice de Tabelas .....	V
Agradecimentos .....	VII
Resumo .....	IX
Abstract.....	IX
Abreviaturas.....	XI
Introdução .....	1
Caracterização do laboratório de estágio .....	2
Hematologia .....	5
Hematopoiese.....	5
Maturação eritrocitária .....	6
Eritrócitos .....	7
Maturação granulocitária.....	7
Neutrófilos .....	8
Eosinófilos.....	8
Basófilos .....	9
Maturação dos monócitos.....	9
Monócitos .....	9
Maturação dos Megacarioblastos .....	10
Plaquetas.....	10
Maturação dos Linfócitos .....	10
Linfócitos.....	11
Hemograma.....	11
Contagem eritrocitária – RBC .....	12
Hematócrito (HCT) .....	13
Concentração de hemoglobina (HGB) .....	13
Volume corpuscular médio (MCV).....	14
Hemoglobina corpuscular média (MCH) .....	14
Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) .....	14
Índice de dispersão do volume eritrocitário (RDW) .....	14
Índice de dispersão do volume de hemoglobina (HDW) .....	15
Contagem de reticulócitos (RET).....	15

Contagem leucocitária (WBC) e respetivo diferencial .....	16
Contagem plaquetar (PLT) .....	17
Índice de dispersão do volume plaquetar (PDW) .....	17
Citoquímica .....	17
Coloração do tipo Romanowsky .....	18
Coloração de Perls .....	18
Coloração Negro de Sudão .....	18
Determinação das hemoglobinas por HPLC e eletroforese.....	18
Estudo dos glóbulos rubros .....	20
Doseamento da glucose-6-fosfato desidrogenase .....	20
Doseamento da haptoglobina.....	21
Teste da solubilidade .....	21
Teste da fragilidade osmótica .....	22
Teste de Kleihauer .....	22
Controlo de qualidade .....	22
Microbiologia.....	23
Técnicas para observação microscópica.....	23
Meios de Cultura .....	25
Amostras biológicas .....	28
Urina .....	28
Urocultura .....	28
Ensaio imunocromatográfico .....	30
Sangue.....	31
Hemocultura.....	31
Pesquisa do antígeno do Citomegalovírus .....	32
Exsudato orofaríngeo .....	33
Vírus Sincicial Respiratório .....	34
Expetoração, Lavado e Aspirado Bronco-alveolar .....	34
Expetoração.....	35
Lavado Broncoalveolar .....	36
Aspirado Broncoalveolar.....	37
LCR.....	38
Fezes .....	39
Coprocultura .....	39

Exame parasitológico .....	40
Ensaio imunocromatográfico .....	41
Exsudato vaginal/uretral.....	43
Soro .....	44
Aglutinação.....	44
Floculação.....	44
Neutralização.....	45
ELISA.....	45
Identificação.....	45
Identificação manual .....	45
Identificação automática.....	47
Testes de suscetibilidade.....	47
Controlo de qualidade .....	48
Conclusão .....	49
Bibliografia.....	51



## Índice de Imagens

Figura 1– Representação esquemática da hematopoiese .....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Figura 2 – Maturação eritrocitária. ....	6
Figura 3 – Maturação granulocitária .....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Figura 4 – Diferenciação dos monócitos.. ....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Figura 5 – Maturação plaquetar. ....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Figura 6 – Maturação dos linfócitos. ....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Figura 7 – Representação esquemática da câmara de Neubauer.	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Figura 8 – Cromatograma de hemoglobinas .....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Figura 9 – Detecção de hemoglobinas em função do tempo de retenção	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Figura 10 – Coloração de Auramina.....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Figura 11 – Teste da blastese com formação de tubos germinativos	<b>Erro! Marcador não definido.</b>

## Índice de Tabelas

Tabela 1– Possíveis interferentes na contagem dos WBC .....	16
Tabela 2 – Possíveis interferentes na contagem plaquetar .....	17
Tabela 3 – Meios de cultura .....	25
Tabela 4 – Critérios para validação de orbitolg para amostras do jato intermédio .....	29
Tabela 5 – Critérios de aceitabilidade de Murray e Washington .....	35





## **Agradecimentos**

Ao Centro Cento Hospitalar do Porto que me concedeu a honra de estagiar num dos maiores hospitais do país.

À Professora Dra. Leonor Almeida que fez todos os possíveis para me garantir o estágio no local onde pretendia.

Ao Dr. Henrique Luz e à Professora Dra. Olga Cardoso por toda a disponibilidade demonstrada durante este período.

À Técnica Marta Gomes e à Dra. Paula Carneiro, as sub-orientadoras.

Aos amigos, em especial à Filipa Lopes e ao Jorge Reis por todo o apoio e ânimo dado.

Ao meu irmão, que para além de me ter fornecido guarida conjuntamente com os meus pais, são base para que tudo se tenha tornado realidade.



## **Resumo**

O estágio curricular do Mestrado em Análises clínicas foi realizado no Centro Hospitalar do Porto durante quatro meses distribuídos pelos serviços de Microbiologia, Química Clínica, Hematologia Laboratorial e Imunologia no Departamento de Patologia Clínica.

Neste relatório é constituído pela caracterização dos diferentes serviços seguido de uma descrição detalhada das atividades desenvolvidas, das metodologias, dos equipamentos e a sua repercussão clínica nos serviços de Hematologia e Microbiologia.

Palavras-chave: Centro Hospitalar do Porto, Microbiologia, Hematologia Laboratorial.

## **Abstract**

The MSc stage in Clinical Analyses was carried out in the Oporto Hospital Center for period of four months and it was distributed by the services of Microbiology, Clinical Chemistry, Laboratory Hematology and Immunology in Clinical Pathology Department.

This report concerns the characterization of the different services, being followed by a detailed description of the activities, methodologies, equipment as well as their clinical repercussion in Laboratory Hematology and Microbiology services.

Key-words: Oporto Hospital Center, Microbiology, Laboratory Hematology.



## Abreviaturas

ADP: Adenosina difosfato

AST-N192: Carta de suscetibilidade para bacilos Gram negativo

AST-P586: Carta de suscetibilidade para *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp e *Enterococcus* spp., catalase negativa

AST-P619: Carta de suscetibilidade para *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp e *Enterococcus* spp., catalase positiva

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATP: Adenosina trifosfato

BCYE: *Buffered Charcoal Yeast Extract agar*

BFU: *Blast-Forming Unit*

CFU: *Colony-Forming Unit*

CHP: Centro Hospitalar do Porto

CLED: Agar de cisteína lactose deficiente em eletrólitos

CIN: Gelose Cedsulodina, Irgasan e Novobiocina

CMI: Concentração mínima inibitória

CMV: Citomegalovírus

CSF-G: *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*

CSF-M: *Macrophage Colony-Stimulating Factor*

CSF-Meg: *Megakaryocyte Colony-Stimulating Factor*

COS: Gelose de Sangue

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

EUCAST: Comité Europeu de Avaliação de Suscetibilidade Antimicrobiana

G6PD: Glucose-6-fosfato desidrogenase

Hb: Hemoglobina

HCT: Hematócrito

HDW: Índice de dispersão do volume de hemoglobina

HGB: Concentração de hemoglobina

HPLC: *High performance liquid chromatography*

HIV: *Human Immunodeficiency Virus*

Ig: Imunoglobulina

INSA: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

LCR: Líquido encefaloraquideo

LUC: Leucócitos grandes sem atividade peroxidásica  
MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization  
MCH: *Mean Corpuscular Hemoglobin*  
MCHC: *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*  
MCV: *Mean Corpuscular Volume*  
MGIT: *Mycobacteria Growth Indicator Tube*  
MHE: Müller-Hinton E  
MHF: Müller-Hinton Fastidious  
M.O.: Microscópio ótico  
NAD: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*  
NADPH: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*  
NH: Carta de suscetibilidade para *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus* spp.  
PANTA: polimixina, anfotericina B, trimetoprim, ácido nalidíxico  
PCR: *Polymerase Chain Reaction*  
PDW: Índice de dispersão do volume plaquetar  
PGDF: fator de crescimento derivado de plaquetas  
PLT: Plaquetas  
PVX: Gelose de chocolate  
PYR: Pirrodonil peptidase  
RBC: *Red Blood Cells*  
RDW: Índice de dispersão do volume eritrocitário  
RET: Reticulócitos  
RIA: *RadioImmuno Assay*  
RPR: Teste de Reagina Plasmática rápida  
RNA: Ácido Ribonucleico  
SS: Meio Salmonella-Shigella  
SEQAS: *Seraqual External Quality Assessment Service*  
TDT: Técnico de Diagnóstico e Terapêutica  
5-HT: 5-hidroxitriptamina  
TSS: Técnico Superior de Saúde  
UK-NEQAS: United Kingdom Nacional External Quality Assessment Schemes  
VDRL: Venereal Disease Research Laboratory  
WBC: *White Blood Cells*  
YST: Carta de suscetibilidade para leveduras e fungos leveduriformes

## **Introdução**

O Centro Hospitalar do Porto é o segundo maior centro hospitalar do norte, sendo uma instituição de reconhecimento e prestígio quer a nível regional quer a nível nacional. Todo o Centro tem como objetivo proporcionar aos utilizadores mais rapidez e comodidade nos serviços prestados estando a investir em novas instalações. O Departamento de Patologia Clínica também tem vindo a inovar desde a criação do laboratório automatizado, na implementação de metodologias mais sensíveis e na aquisição de equipamentos modernos.

O estágio decorreu entre o dia 5 a 31 de janeiro de 2015 e de 9 de março a 29 de maio de 2015, estando um mês em cada sector (Microbiologia, Química Clínica, Hematologia Laboratorial e Imunologia), num total de aproximadamente 600 horas sob orientação externa do Dr. Henrique Luís Lopes Ferreira Reguengo da Luz e orientação interna da Professora Dra. Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso. O estágio permitiu assim, consolidar conhecimentos teóricos previamente adquiridos, contactar com a rotina laboratorial, com equipamentos e produtos que num laboratório privado não seria possível.

Este relatório foca-se nos sectores de Hematologia Laboratorial e de Microbiologia, tendo a escolha recaído quer no gosto pessoal que tenho por ambas as áreas, quer pelo desafio que elas representam.

Durante o período de estágio adquiri competências técnicas como teóricas que me permitirão sair deste mestrado com as qualificações necessárias para entrar no mercado de trabalho.

## **Caracterização do laboratório de estágio**

O Departamento de Patologia do Centro Hospitalar do Porto tem como objetivo proporcionar a realização e validação das análises solicitadas pelo próprio hospital (Hospital Geral Santo António), dos que fazem parte do centro hospitalar (Hospital Joaquim Urbano, Hospital Maria Pia, Maternidade Júlio Dinis) e ainda hospitais de fora ao CHP que solicitam análises específicas.

Este departamento é constituído por diferentes serviços onde cada um tem um diretor diferente. Os serviços abrangidos pelo departamento são: o de anatomia patológica, o laboratório centralizado (CoreLab), de microbiologia, de química clínica, de hematologia laboratorial e imunologia. Com a existência do CoreLab, criado em 2008, o grosso das análises clínicas (bioquímica geral e hemogramas) são lá efetuadas, ficando os restantes serviços com uma especialização nas análises.

### **Serviço de Imunologia**

O serviço de Imunologia é dirigido pela Dra. Esmeralda Neves e composto por mais duas médicas, cinco TSS (Técnico Superior de Saúde), quatro TDT (Técnico de Diagnóstico e Terapêutica), uma administrativa e uma auxiliar de ação médica. Este, está aberto das 8h às 18h recebendo uma média diária de 150 a 200 amostras sendo que, qualquer amostra proveniente do serviço de urgência é armazenada no CoreLab e enviada ao serviço no dia seguinte.

Essencialmente, o laboratório está dividido nas duas áreas principais da imunologia, isto é, na imunidade celular e na imunidade humoral sendo que esta ultima está subdividida em imunoquímica e auto-imunidade.

O serviço tem à sua disposição a seguinte tecnologia:

- 3 Citómetros de fluxo da Beckman Coulter: permite, por exemplo, estudo das populações linfocitárias e monitorização de doentes com HIV;
- 2 Nefelómetros, o Image 800 da Beckman Coulter e o BNII da Siemens onde, por exemplo, se realizam os doseamentos das imunoglobulinas (A, M, G e D) e das suas cadeias leves;
- O Capillarys 2 e o Hydrasys da Sebia que permite a realização de electroforeses para a deteção de bandas mono e policlonais;



- Triturus da Grifols realiza ELISAS cujo resultado é extrapolado de uma curva padrão. Aqui são realizados por exemplo a quantificação do fator intrínseco, da alfa-fodrina, do interferon  $\gamma$ , entre outros;

- 2 Quanta Lyser 160, um deles destinados à preparação das lâminas para observação a microscopia de fluorescência e o outro para a realização de ELISAS onde o valor obtido é calculado a partir de um cálculo;

- Bioflash da INOVA usa a metodologia de quimiluminescência;

- ImmunoCap 250 da Phadia é usado para a determinação de auto-anticorpos e alérgenos.

O controlo de qualidade interno é realizado diariamente antes de ser introduzida qualquer amostra e depende dos controlos fornecidos pelas casas comerciais. Já o controlo de qualidade externo, ao abrigo do programa do UK-NEQAS e do INSA, é realizado mensalmente.

## **Serviço de Química Clínica**

O serviço de Química Clínica é dirigido pelo Dr. José Carlos Oliveira e composto por mais três médicos, três TSS, cinco TDT, uma administrativa e uma auxiliar de ação médica. Este, está aberto das 8h às 17h e recebe diariamente entre 250 a 300 amostras.

No serviço estão implementados as seguintes metodologias:

- Espermograma;

- Análise do sedimento urinário (Sysmex Urinalyser);

- Estudo farmacocinético por quimiluminescência (Architech i2000 da Abbott) e fotometria (Cobas Integra 800 da Roche);

- Doseamento de marcadores tumorais por espectralfotometria de massa;

- Doseamento de proteínas por quimiluminescência (Immulite 1000 e Vista 1500 da Siemens);

- Absorção atómica para determinação de oligoelementos (cobre e zinco);

- ELISA;

- Radioimunoensaio (RIA) para pesquisa de hormonas como a progesterona;

- HPLC para pesquisa de HbA<sub>1</sub> catecolaminas e vitaminas;

- Eletroforese de proteínas séricas e urinárias (Hydrasys 2 Scan da Sebia);

- Pesquisa de sangue oculto das fezes;
- Determinação da osmolalidade (Osmometer 3320).

O controlo de qualidade interno é realizado diariamente e depende dos controlos fornecidos pelas casas comerciais. Já o controlo de qualidade externo (UK-NEQAS e SEQAS) é realizado mensalmente.

## **Serviço de Hematologia Laboratorial**

O serviço de Hematologia Laboratorial dirigido pela Dra. Inês Freitas e composto por mais dois médicos, duas TDTs, uma administrativa e uma auxiliar de ação médica. O seu horário de funcionamento é das 8h às 17h recebendo produtos essencialmente do serviço pediátrico e neonatal, bem como medulogramas perfazendo diariamente, em média, 150-200 amostras.

## **Serviço de Microbiologia**

O serviço de microbiologia é dirigido pela Dra. Maria Helena Ramos e constituído por mais 4 médicos, uma TSS, 13 TDT, 2 administrativas e uma auxiliar de ação médica. O horário de funcionamento é das 8h-24h todos os dias e, recebe cerca de 400-450 amostras diárias.

O serviço encontra-se subdividido nos sectores de serologia, bacteriologia, parasitologia e micologia e virologia. O sector de bacteriologia esta dividido em 4 blocos sendo que cada bloco recebe produtos dos restantes serviços hospitalares, dividindo o volume de trabalho pelos blocos. Para além destes quatro blocos existe ainda outro que processa exclusivamente bactérias anaeróbias.

# Hematologia

Hematologia é a ciência que estuda o sangue (*Haimatos+logos*).

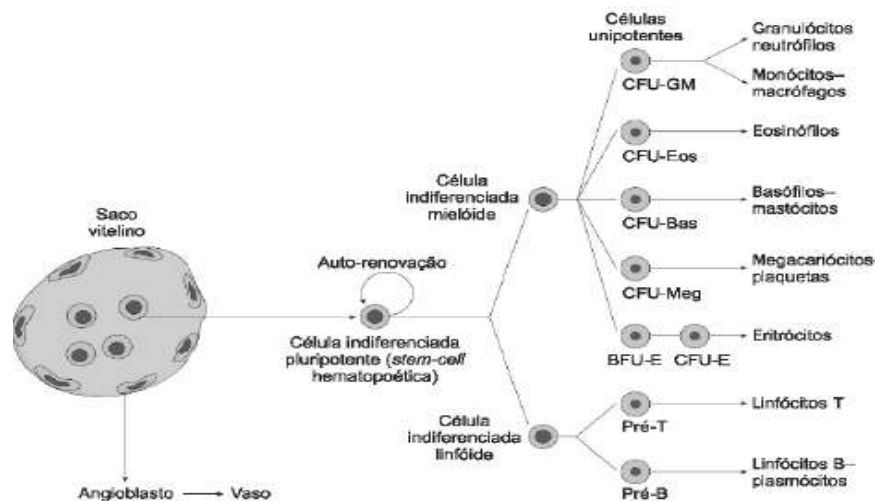
No CHP a Hematologia encontra-se dividida em 3 setores: Hematologia Clínica (realiza estudos de hemóstase, realiza diagnóstico e tratamento), hematologia laboratorial e o CoreLab (realização dos hemogramas provenientes do internamento, consultas e urgências com exceção da pediatria em horário útil).

O estágio abrangeu o setor da hematologia laboratorial no qual foi possível:

- Determinação do Hemograma (automático e manual);
- Observação de esfregaços de sangue periférico (desde a coloração do tipo Romanowsky, contagem de reticulócitos, coloração de Perls, coloração de Negro Sudão);
- Determinação das hemoglobinas por HPLC e electroforese;
- Estudos do glóbulo rubro: doseamento da glicose-6-fosfato, doseamento da haptoglobina, teste da fragilidade osmótica, teste da solubilidade, teste de Kleihauer.

## Hematopoiese

A hematopoiese corresponde ao processo de multiplicação e maturação das células precursoras dos glóbulos vermelhos (eritropoiese), glóbulos brancos e plaquetas ao nível da medula óssea. Todas estas células têm uma célula precursora comum – células tronco hematopoéticas – células multipotentes (autorrenováveis). Estas vão sofrer diferentes estímulos, pela ação de fatores diferenciadores, originando células progenitoras (CFU- unidades formadoras de colónias; BFU- unidades formadoras de blastos) mieloides e linfoides, que posteriormente se diferenciaram nas células sanguíneas, tal como exemplifica a figura 1 (1).

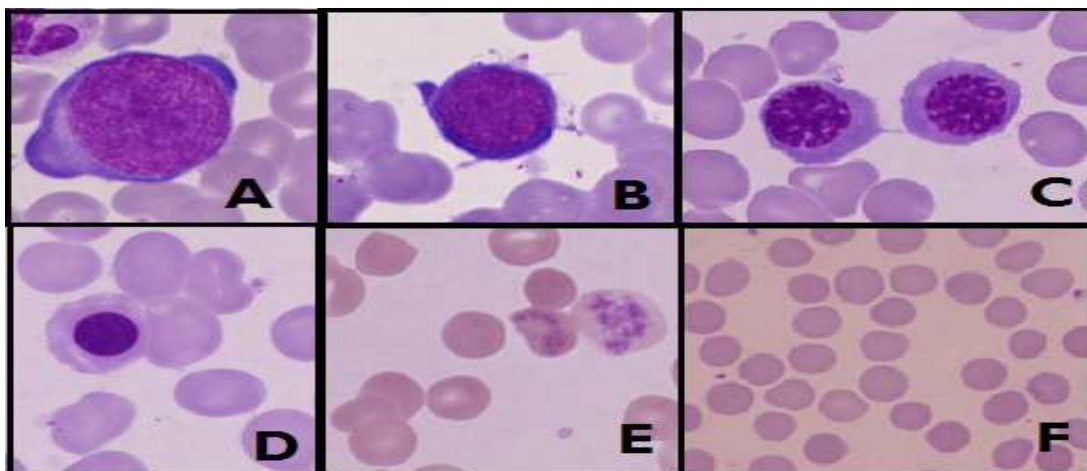


**Figura 1 – Representação esquemática da hematopoiese.**

### **Maturação eritrocitária**

A maturação dos eritrócitos desencadeia-se num processo natural sendo hiperestimulado quando existe um decréscimo acentuado no nível de eritrócitos no sangue que se reflectem numa perda de hemoglobina, conduzindo à diminuição do transporte de oxigénio, hipóxia. A medula óssea vai receber o estímulo da eritropoietina no sentido de repor os níveis de oxigénio.

Assim, o eritroblasto (célula mais precursora dos eritrócitos) sofre o processo de maturação originando, segundo a ordem maturativa, o normoblasto basófilo, normoblasto policromático, normoblasto ortocromático, reticulócito e por fim o eritrócito, representados na figura 2 pelas letras de A a F (respetivamente).



**Figura 2 – Maturação eritrocitária.** Pelas letras encontram-se representados: A- Eritroblasto; B- Normoblasto basófilo; C- Normoblasto policromático; D- Normoblasto ortocromático; E- Reticulócito; F- Eritrócitos.

## **Eritrócitos**

São células bicôncavas, anucleadas uma vez que vão perdendo o núcleo e os restantes organelos na maturação, perdendo a capacidade de se dividir, de sintetizar proteínas e de realizar fosforilação oxidativa. Assim sendo, a sua única fonte de energia é dependente dos transportadores de glicose existentes na sua membrana, processando a glicose pela via glicolítica (1).

O seu interior é constituído maioritariamente por hemoglobina, molécula responsável pela cor dos eritrócitos. A hemoglobina é composta por quatro cadeias peptídicas (podem ser cadeia do tipo  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\delta$ ) portadoras, cada uma, de um grupo heme, ligadas à globina onde o ferro assume a estrutura central.

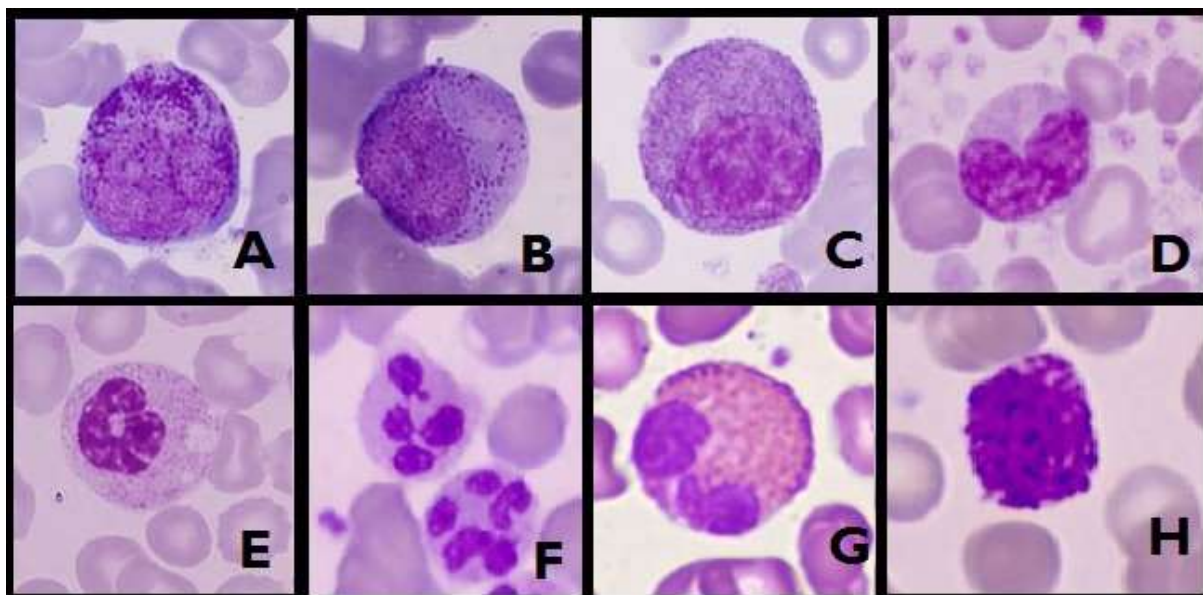
Os eritrócitos podem sofrer anomalias: na forma como células em foice (anemia falciforme), esferócitos (esferocitose hereditária), células em alvo (deficiências em ferro, hepatopatias e hemoglobinopatias), entre outros; no tamanho: células microcíticas (anemia ferropriva, talassemias e anemia sideroblástica) e células macrocíticas (anemia por deficiência de vitamina B12 ou folato); e na estrutura: parasitas (esquizontes de *Plasmodium* spp.), inclusões eritrocitária como os corpos de Howell- Jolly (anemias megaloblásticas).

## **Maturação granulocitária**

A maturação dos granulócitos é estimulada pelo CSF-G (fator estimulador de colónias granulocíticas) que, leva à perda de visualização dos nucléolos por condensação da cromatina, a relação citoplasma/núcleo vai aumentar, o citoplasma vai-se tornando acidófilo e os grânulos primários ou imaturos vão ser substituídos por grânulos secundários (basófilos). A célula à medida que se vai diferenciando torna-se mais pequena e nas últimas fases de diferenciação o núcleo torna-se segmentado.

A maturação começa com o mieloblasto que vai-se diferenciar, pela seguinte ordem, em promielócito (onde aparecem os grânulos primários), mielócito (surgimento dos grânulos secundários), metamielócito, granulócito não segmentado e célula madura (neutrófilo, eosinófilo, basófilo), representados na figura 3 pelas letras de A a H (respetivamente).

A medula óssea contém mais células mielóides do que células eritróides, na proporção de 2:1 a 4:1 predominando neutrófilos e metamielócitos (1).



**Figura 3 – Maturação granulocitária.** Pelas letras encontram-se representados: A- Mieloblasto; B- Promielócito; C- Mielócito; D- Metamielócito; E- Granulócito não segmentado; F- Neutrófilo; G- Eosinófilo; H- Basófilo.

### Neutrófilos

Os neutrófilos são células com um núcleo denso com dois a cinco lóbulos, com uma grande abundância de finos grânulos e citoplasma irregular. Os grânulos são de origem lisossômica sendo que os primários contêm mieloperoxidase, fosfatase ácida, esterase e  $\beta$ -galactosidase enquanto que, os grânulos secundários contêm no seu interior colagenase, lactoferrina, lisozima e aminopeptidase. Na corrente sanguínea tem um tempo de semi-vida de 6 a 10 horas (1). Têm funções de fagocitose sobre microrganismos (por exemplo bactérias), conseguido por ação das enzimas existentes nos grânulos.

Em situações patológicas pode haver aumento do número de neutrófilos – neutrofilia – que é comum em infeções bacterianas ou, diminuição do número – neutropenia – que ocorre na esplenomegalia, na síndrome de Kostmann, no uso de alguns fármacos, entre outros. Outra situação patológica é a hiperlobulação (quando superior a 6 lóbulos) no caso da anemia perniciosa.

### Eosinófilos

Os eosinófilos são bastante semelhantes aos neutrófilos, normalmente são maiores que os neutrófilos e raramente têm mais de 3 lóbulos, os seus grânulos também são maiores e coram de vermelho alaranjado e o seu tempo de semi-vida é de 8 a 12 horas. A sua função no organismo está associada a reações alérgicas uma vez que os seus grânulos contêm uma elevada quantidade de histamina.

O aumento de eosinófilos, eosinofilia, ocorre nas infecções por helmintas, em reações de hipersensibilidade, entre outros.

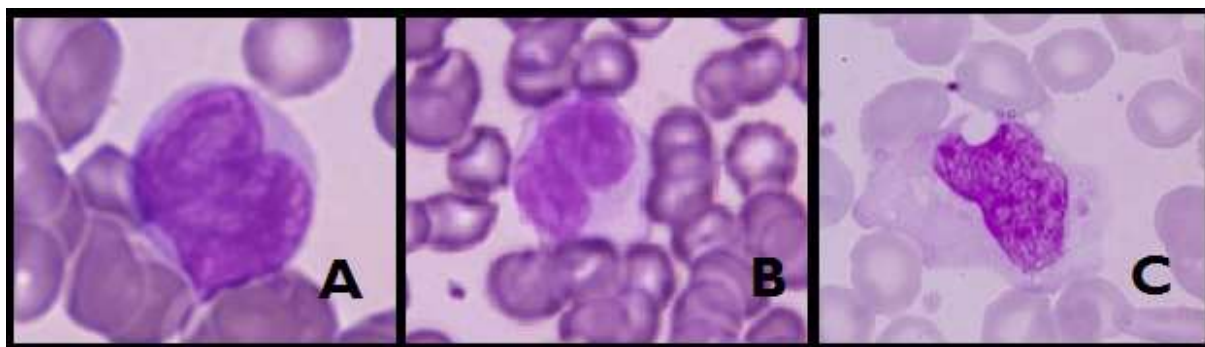
### **Basófilos**

São células que apresentam numerosos e densos grânulos citoplasmáticos que cobrem o núcleo tendo estes no seu interior heparina e histamina e têm locais para ligação da IgE. Devido a libertação de histamina desempenha funções nas reações de hipersensibilidade.

O aumento do seu número em circulação tem como causa geralmente doenças mieloproliferativas como é o caso da leucemia mieloide crónica.

### **Maturação dos monócitos**

Os monoblastos (células precursoras dos monócitos) quando estimuladas pelo CSF-M (fator estimulador de colónias de macrófagos) diferenciam-se em pró-monócito e posteriormente em monócitos, representados na figura 4 pelas letras de A a C (respetivamente). Quando estas células migram para os tecidos recebem o nome de macrófagos.



**Figura 4 – Diferenciação dos monócitos.** Pelas letras encontram-se representados: A- Monoblastos; B- Pró-monócitos; C- Monócitos.

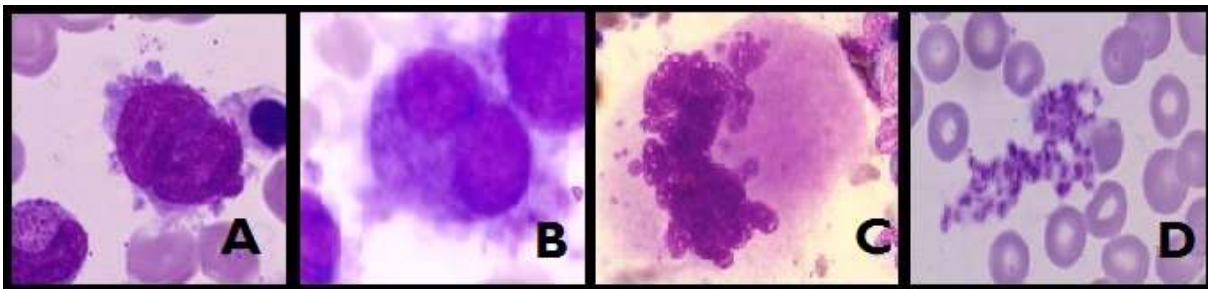
### **Monócitos**

De todas as células leucocitárias, os monócitos são, normalmente, as maiores células do sangue periférico. Têm um núcleo grande, oval ou em forma de rim e o citoplasma tem finíssimos grânulos atribuindo-lhe uma aparência de vidro moído. Em circulação periférica o tempo de semi-vida é de 20 a 40 horas no entanto se estes se deslocarem para os tecidos acabam por amadurecer para macrófagos, o tempo de semi-vida aumenta para meses ou anos (1). Para além das suas funções de defesa contra agentes estranhos (como bactérias ou vírus)

também são responsáveis pela digestão de células mortas, senescentes ou alteradas (células tumorais).

### **Maturação dos Megacarioblastos**

Os megacarioblastos são as células precursoras das plaquetas, sendo estimulada a sua diferenciação pela trombopoetina e pelo CSF-Meg (fator estimulador de colônias de megacariócitos). Assim, a diferenciação desenvolve-se a partir dos megacarioblastos, para o promegacariócito, megacariócito e plaquetas, representado na figura 5 pelas letras de A a D (respetivamente).



**Figura 5 – Maturação plaquetar.** Pelas letras encontram-se representados: A- Megacarioblasto; B- Prómegacariócito; C- Megacariócito; D- Plaquetas.

### **Plaquetas**

As plaquetas resultam da fragmentação do citoplasma do megacariócito na medula óssea, sendo que cada megacariócito é capaz de originar entre mil a cinco mil plaquetas e estas tem um tempo de vida médio de 7 a 10 dias na corrente sanguínea.

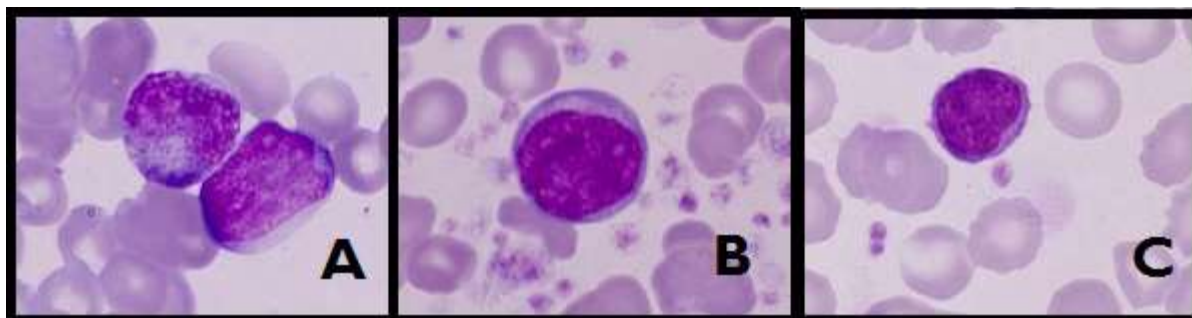
As plaquetas contêm três tipos de grânulos de armazenamento, os grânulos densos (menos numerosos e contem ADP, ATP, 5-HT e cálcio), os grânulos  $\alpha$  (mais numerosos e contem PGDF, fibrinogénio, fator de von Willebrand e outros fatores de coagulação) e os lisossomas (contem enzimas hidrolíticas). Para além dos grânulos as plaquetas na sua estrutura de revestimento têm glicoproteínas importantes nas reações de adesão e agregação plaquetar.

Assim, as plaquetas têm um papel ativo no processo de coagulação do sangue impedindo de sangue em lesões vasculares (1).

### **Maturação dos Linfócitos**

Os linfoblastos diferenciam-se na medula em pró-lymfócitos sendo posteriormente diferenciados em linfócitos no baço, timo e nódulos linfáticos. As células encontram-se representadas na figura 6 pelas letras de A a C consoante o processo de diferenciação.





**Figura 6 – Maturação dos linfócitos.** Pelas letras encontram-se representados: A-Linfoblastos; B-Pró-linfócitos; C- Linfócitos.

### **Linfócitos**

Os linfócitos são células de tamanho variável e podendo ser de dois tipos: os linfócitos T responsáveis pela imunidade celular ou os linfócitos B responsáveis pela imunidade humoral. Os linfócitos T vão estimular a produção de anticorpos pelos linfócitos B ou agem diretamente sobre o agente estranho, destruindo-o. Já os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos, as chamadas imunoglobulinas (Ig). Assim sendo, os linfócitos tal como todos os leucócitos tem uma atividade contra os agentes externos e agentes internos que possam a ser reconhecidos como estranhos ao organismo.

### **Hemograma**

O hemograma é usado como auxiliar no rastreio, diagnóstico e monitorização de diferentes patologias, e inclui a quantificação a avaliação morfológica das células sanguíneas.

O hemograma automático é efetuado no ADVIA 2120 que tem como base de funcionamento a citometria de fluxo. A citometria de fluxo é processo que permite a avaliação das características célula a célula, com recurso a um feixe de luz que conduz a sua dispersão. Esta dispersão traduz informação sobre o tamanho, estrutura interna, granularidade, morfologia da superfície (características físicas) ou características químicas (2).

Este equipamento analisa a população leucocitária por citometria de fluxo de duas formas: o canal de peroxidases que consoante a presença de peroxidase nas células são distinguidos os leucócitos das restantes células sanguíneas e, o canal dos basófilos onde as células são contadas e separadas em polimorfonucleares e mononucleares baseando-se no tamanho, densidade e forma nuclear. Os glóbulos vermelhos e as plaquetas são analisados e medidos por impedância (princípio de Coulter) isto é, as células quando imersas num meio

condutor interrompem um sinal elétrico, emitindo pulsos elétricos. A quantidade de pulsos é proporcional ao número de células e a sua amplitude é proporcional ao volume (menor amplitude, menor volume) (3). A hemoglobina é analisada pelo método da cianometahemoglobina que consiste na oxidação dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  pelo ferrocianeto de potássio com formação de  $\text{Fe}^{3+}$  resultando na formação da metahemoglobina que é lida por espectrofotometria a 540nm (3). Já os reticulócitos são analisados por citometria de fluxo (fluorescência), isto porque os reticulócitos são corados com o corante supravital Oxazina 750 e desta forma são contadas as células que estão coradas por este corante.

O hemograma manual é realizado recorrendo a uma câmara de Neubauer, tubos de capilaridade, centrifugador, esfregaços de sangue periférico e cálculos.

O hemograma permite avaliar os seguintes parâmetros:

- Contagem eritrocitária (RBC);
- Hematócrito (HCT);
- Concentração de hemoglobina (HGB);
- Índices eritrocitários (MCV- volume corpuscular médio; MCH – Hemoglobina corpuscular média; MCHC- concentração de hemoglobina corpuscular média);
- Índice de dispersão do volume eritrocitário (RDW);
- Índice de dispersão do volume de hemoglobina (HDW);
- Contagem de reticulócitos (RET);
- Contagem leucocitária (WBC) e respetivo diferencial;
- Contagem Plaquetar (PLT);
- Índice de dispersão do volume plaquetar (PDW).

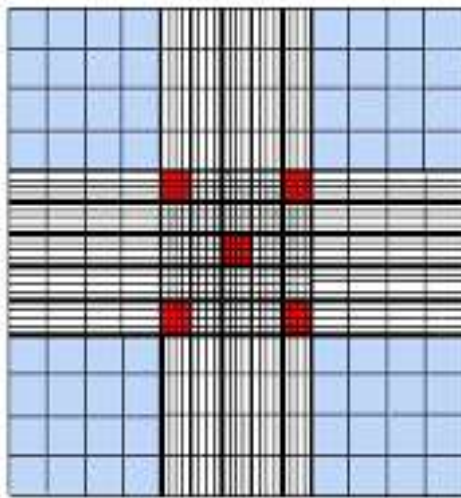
### **Contagem eritrocitária – RBC**

A contagem eritrocitária referencia o número de eritrócitos por unidade de volume de sangue.

Contagem automática: contagem por impedância.

Contagem manual: a amostra é diluída na solução de Dacie numa proporção de 1:200, sendo posteriormente contados os eritrócitos ao M.O. numa câmara de Neubauer em 5 dos quadrados centrais como está ilustrado na figura 7. Posteriormente é calculado o  $\text{RBC} = \text{n}^\circ \text{ de eritrócitos} \times 200 \text{ (fator de diluição)} \times 5 \text{ (conta-se 5 quadrados e pretende-se os 25 quadrados centrais)} \times 10 \text{ (cada quadrado grande corresponde a } 0,1\mu\text{L então multiplica-se por 10 para obter o volume de } 1\mu\text{L)}$ .

O valor de referência para o homem varia entre  $4,5-6,5 \times 10^6$  células/ $\mu\text{L}$  e para a mulher  $3,9-5,6 \times 10^6$  células/ $\mu\text{L}$  (1) já para a população pediátrica o valor referencia varia desde o nascimento  $6 \times 10^6$  células/ $\mu\text{L}$  até à puberdade  $4,6 \times 10^6$  células/ $\mu\text{L}$  (3).



**Figura 7 – Representação esquemática da câmara de Neubauer.** Ao centro, a vermelho precede-se à contagem de 5 dos 25 quadrados para os eritrócitos e plaquetas. Na periferia, a azul, conta-se os 4 grandes quadrados para a contagem de leucócitos.

### **Hematócrito (HCT)**

O hematócrito corresponde ao volume ocupado pelos eritrócitos contidos num certo volume de sangue.

Hemograma automático: calculo pela fórmula  $\text{HCT} = \text{VCM} \times \text{RBC}$ .

Hemograma manual: usa-se um tubo de capilaridade de 75mm o qual se enche cerca de dois terços e tapa-se uma extremidade com plasticina, centrifuga-se 5 minutos a 300 rotações por minuto e, mede-se a parte dos glóbulos vermelhos e do plasma (valor dos glóbulos vermelhos / valor do plasma).

O hematócrito tem valores de 40-52% para os homens e de 36-48% para as mulheres (1). Como o hematócrito tem influência direta dos RBC este, será maior em recém-nascidos.

### **Concentração de hemoglobina (HGB)**

A HGB representa a hemoglobina existente num dado volume de sangue, podendo ser esta eritrocitária ou plasmática, sendo um importante parâmetro no diagnóstico de anemias.

Hemograma automático: obtido através do método de cianometohemoglobina.

Os valores de referência para as mulheres variam entre 11,5-15,5 g/dL e para os homens entre 13,5-17,5 g/dL (1), para o pediátrico o valor também é maior em consequência de haver

mais eritrócitos. No entanto este valor poderá sofrer variações em função da altitude, postura e idade.

### **Volume corpuscular médio (MCV)**

O MCV representa o volume médio dos eritrócitos.

Hemograma automático: contagem por impedância.

Hemograma manual: calculado com base na seguinte fórmula  $MCV = HCT/RBC \times 10$

(3).

O valor é expresso em fL e é compreendido entre 80-95fL (1) em ambos os sexos.

### **Hemoglobina corpuscular média (MCH)**

Expressa a quantidade média de hemoglobina existente.

Hemograma automático e manual: o parâmetro é calculado tendo em conta a seguinte fórmula:  $MCH = (HGB / RBC) \times 10$  (3).

Os valores de referência são iguais para ambos os sexos e oscilam entre 27 e 34 pg (1). Quando os valores são inferiores aos de referência fala-se em hipocromia, ou seja os eritrócitos aparecem descorados sendo comum em anemias ferroprivas, anemias sideroblásticas e talassemias. Já valores superiores indicam que o eritrócito aparece hiperpigmentado (hipercromia) sendo comum na esferocitose.

### **Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC)**

A MCHC indica a concentração de hemoglobina que existe em média dentro de cada eritrócito sendo que, os valores de referência variam entre 20 e 35 g/dl (1).

Hemograma automático e manual: calculado através da seguinte formula  $MCHC = (HGB/HCT) \times 100$  (3).

### **Índice de dispersão do volume eritrocitário (RDW)**

O RDW permite avaliar o grau de disparidade do tamanho dos eritrócitos, ou seja, avalia o grau de anisocitose sendo que este deve ser inferior a 15% (3).

Hemograma automático: efetuado pelo contador automático.

Hemograma manual: não se calcula nem se tem um valor certo, é uma avaliação qualitativa através da visualização do esfregaço sanguíneo.

### **Índice de dispersão do volume de hemoglobina (HDW)**

Este índice representa o grau de anisocromia, ou seja, a variação da concentração da hemoglobina que é responsável pela cor dos eritrócitos traduzindo-se assim numa variação de cor dos mesmos (4).

O valor de referência é de 1,82-2,64 g/dL (3) e este valor só é determinado no hemograma automático sendo que no manual pode-se fazer uma apreciação qualitativa.

### **Contagem de reticulócitos (RET)**

Os reticulócitos correspondem aos eritrócitos imaturos presentes na corrente sanguínea que ainda contem RNA remanescente. O seu valor é representativo da atividade medular permitindo diferenciar anemias hipoproliferativas (anemia ferropriva) de anemias hiperproliferativas (anemia hemolítica).

Hemograma automático: contagem por citometria.

Hemograma manual: observa-se um esfregaço sanguíneo corado com azul metileno e procede-se à contagem dos reticulócitos em 1000 eritrócitos.

Os resultados são expressos em percentagem, estando o valor normal compreendido entre 0,5 e 2,5% em adultos (3).

### **Possíveis interferências na contagem eritrocitária**

Na amostra existem vários fatores intrínsecos a ela que podem falsear os resultados numa contagem automática.

Quando o sangue se encontra lipémico, com aumento de proteínas, bilirrubinémico ou quando existe uma grande quantidade de leucócitos podem conduzir a um falso aumento da hemoglobina, uma vez que vão interferir com a leitura da absorvância da molécula. Interferindo posteriormente no MCH e MCHC.

O número de RBC também pode ser falsamente baixo caso haja a presença de aglutininas que conduzem a adesão uns aos outros e serão contados como um só. Contudo o seu número pode aumentar caso existam plaquetas gigantes que, poderão ser contadas como RBC ou WBC.

Uma amostra coagulada condiciona a leitura do HCT (diminuição), a leucocitose leva ao aumento do MCV, constituindo estes alguns dos possíveis interferentes.

### **Contagem leucocitária (WBC) e respetivo diferencial**

O WBC representa o número de leucócitos num dado volume de sangue.

Hemograma automático: citometria de fluxo.

Hemograma manual: a amostra é diluída em ácido acético glacial numa proporção de 1:20, sendo posteriormente contados os leucócitos ao M.O. numa câmara de Neubauer nos quadrados periféricos como está ilustrado na figura 7. Posteriormente é calculado o  $WBC = n^{\circ} \text{ de leucócitos} \times 20 \text{ (fator de diluição)} \times 2,5 \text{ (só se contou } 0,4\mu\text{L, uma vez que cada quadrado grande corresponde a } 0,1\mu\text{L e necessitamos de ter } 1\mu\text{L)}$ . Para o diferencial faz-se um esfregaço de sangue periférico corado por uma coloração do tipo Romanowsky e conta-se 200 leucócitos.

O valor de referência de leucócitos é igual para ambos os sexos e na sua totalidade oscila entre  $4 \text{ a } 11 \times 10^3 \text{ células}/\mu\text{L}$ . No diferencial leucocitário deverá sempre preferir-se o valor absoluto face ao percentual, uma vez que este pode induzir a uma falsa interpretação. Assim sendo os valores de referência para o diferencial são os seguintes: neutrófilos  $2,5\text{-}7,5 \times 10^3 \text{ células}/\mu\text{L}$  (40-80%); linfócitos  $1,5\text{-}3,5 \times 10^3 \text{ células}/\mu\text{L}$  (20-40%); monócitos  $0,2\text{-}0,8 \times 10^3 \text{ células}/\mu\text{L}$  (2-10%); eosinófilos  $0,04\text{-}0,44 \times 10^3 \text{ células}/\mu\text{L}$  (1-6%); basófilos  $0,01\text{-}0,1 \times 10^3 \text{ células}/\mu\text{L}$  (<1-2%) (1).

O ADVIA 2120 determina também os leucócitos grandes sem atividade peroxidásica (LUC), podendo representar linfócitos grandes atípicos, plasmócitos ou blastos. Para um valor inferior 4% deve-se considerar normal. No entanto quando este se encontra aumentado e é acompanhado de trombocitopenia, anemia e/ou leucocitose e um esfregaço indicativo da presença destas células é provável a existência de uma patologia maligna mas se não houver correlação com o esfregaço poderá tratar-se de um défice na peroxidase.

Os resultados da contagem leucocitária podem ser falseados, na tabela 1 encontram-se algumas interferências.

**Tabela 1 – Possíveis interferentes na contagem dos WBC.**

Parâmetro	Decréscimo	Aumento
WBC	Amostra coagulada	Plaquetas gigantes
	Agregados de WBC	Agregados plaquetares
		Parasitas

### **Contagem plaquetar (PLT)**

Tal como o RBC e WBC, o PLT corresponde ao número de plaquetas existentes num dado volume de sangue e, o seu valor de referência oscila entre as 150 a  $400 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$  (1) nos adultos e 170 a  $500 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$  em crianças (3).

Hemograma automático: contagem por impedância.

Hemograma manual: a amostra é diluída em oxalato de amónio numa proporção de 1:20, sendo posteriormente contadas as plaquetas ao M.O. numa câmara de Neubauer em 5 dos 25 quadrados centrais tal como foi ilustrado na figura 7. Posteriormente é calculado o  $\text{PLT} = \text{n}^\circ \text{ de plaquetas} \times 20 \text{ (fator de diluição)} \times 5 \text{ (contou-se 5 quadrados e pretende-se uma contagem para os 25 quadrados centrais)} \times 10 \text{ (para obter o volume de } 1 \mu\text{L)}.$

Também na contagem plaquetar podem existir interferências que conduzem a um falso resultado, pode-se ver alguns dos exemplos na tabela 2.

**Tabela 2 – Possíveis interferentes na contagem plaquetar.**

Parâmetro	Decréscimo	Aumento
PLT	Aglutinação plaquetar	Fragmentos de RBC e de WBC
	Plaquetas gigantes	Crioglobulinas
	Amostra coagulada	

### **Índice de dispersão do volume plaquetar (PDW)**

O PDW indica a heterogeneidade do volume plaquetar, ou seja, a sua anisocitose. Contudo é importante a realização do esfregaço sanguíneo para verificar se existe a presença de plaquetas gigantes e confirmar a anisocitose.

## **Citoquímica**

As técnicas de citoquímica permitem: a contagem diferencial de leucócitos; notar a presença de células precursoras das diferentes linhas celulares; as alterações morfológicas celulares; avaliar a presença de ferro; detetar a presença de parasitas; e diferenciar células através da atividade de enzimas. Como tal existem varias técnicas que permitem assim avaliar diferentes aspetos, podendo ser usadas em esfregaços de sangue periféricos ou em esfregaços de medula óssea.

### **Coloração do tipo Romanowsky**

Esta coloração é composta por dois corantes o azul de metileno que cora de azul as estruturas basófilas (como por exemplo os ácidos nucleicos) e a eosina que cora de rosa as estruturas acidófilas (como por exemplo a hemoglobina) (3).

A coloração é usada como rotina para a visualização do esfregaço de sangue periférico e contagem diferencial leucocitária, avaliação de alterações morfológicas, detetar presença de células precursoras e parasitas, como por exemplo microfilárias (*Loa*, entre outras) e protozoários (*Plasmodium* spp., entre outros).

### **Coloração de Perls**

A coloração de Perls ou Azul da Prússia baseia-se na reação entre o reagente (ferrocianeto de potássio) com o íao férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) da hemossiderina, resultando um precipitado azul quando está presente. Esta coloração permite avaliar os depósitos de ferro existentes na medula óssea (aspiração da medula óssea) e os eritrócitos que contem sideróferos no sangue periférico (3).

### **Coloração Negro de Sudão**

Esta coloração pode ser realizada em aspirados de medula óssea e em sangue periférico. O corante negro de Sudão liga-se irreversivelmente aos granulócitos e alguns monócitos tendo um papel semelhante ao da mieloperoxidase (que existe nestas células) assim, os granulócitos e seus precursores apresentam os grânulos escuros e grossos no citoplasma. Esta coloração é útil em Leucemias mioblásticas agudas com síntese inadequada de mieloperoxidase (3).

## **Determinação das hemoglobinas por HPLC e eletroforese**

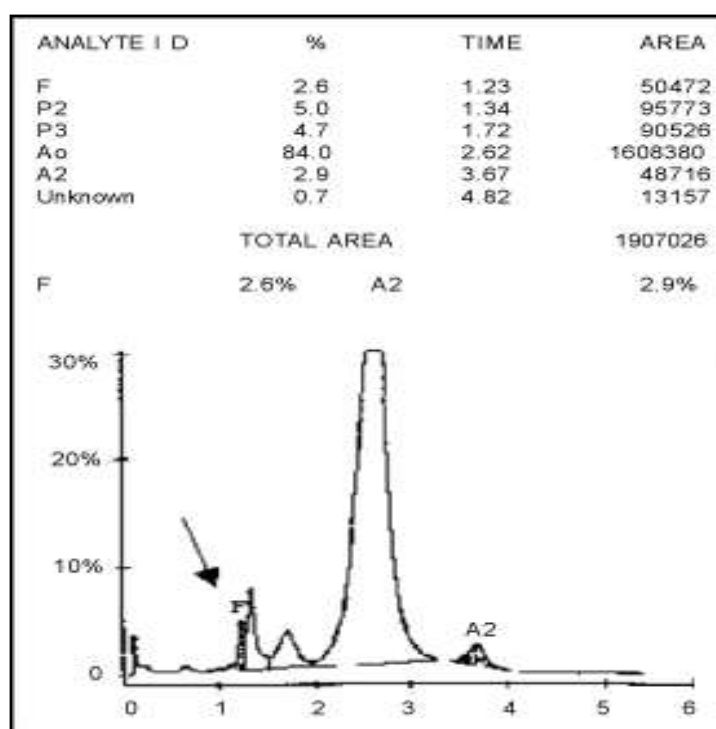
A hemoglobina como já referido é constituída por cadeias peptídicas e são estas diferentes cadeias que constituem as diferentes hemoglobinas.

Num individuo saudável adulto a hemoglobina (Hb) predominante é a HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) em cerca de 97%, mas também estão presentes HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) e a HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ). Nos recém-nascidos a hemoglobina predominante é a HbF que vai sendo progressivamente substituída pela HbA.

Contudo, durante a síntese de hemoglobina podem surgir hemoglobinas anormais (HbS, por exemplo), haver redução das hemoglobinas normais (talassemias) ou haver persistência da hemoglobina fetal na vida adulta.



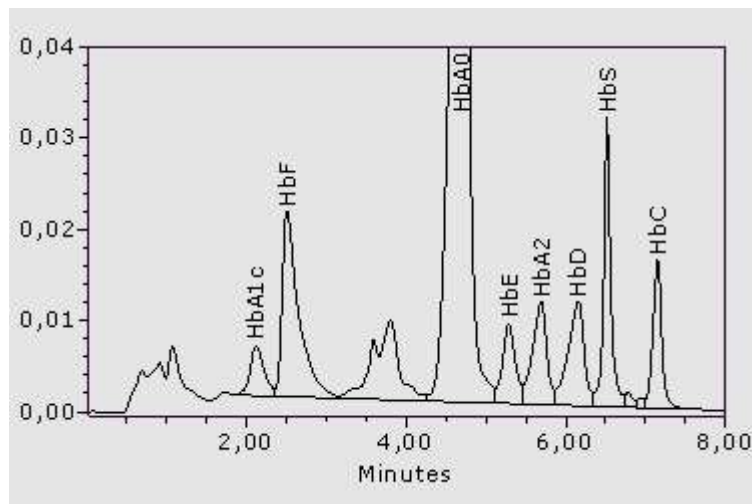
De forma a avaliar hemoglobinopatias o serviço tem a disposição o Analisador Variant II da Bio-Rad cuja base de funcionamento é a cromatografia líquida de alta afinidade (HPLC). Este equipamento após injetar a amostra no seu circuito de alta pressão as moléculas de hemoglobina diferentes ficam retidas na coluna e eluem da mesma em tempos diferentes. A leitura é realizada a 415nm (e 690 nm para minimizar interferências) sendo a sua absorvância proporcional à concentração de dada hemoglobina na amostra. Posteriormente, o sistema informático traduz a absorvância num cromatograma que nos dá a percentagem de hemoglobina relativa existente na amostra em função do tempo de retenção (5), como o cromatograma da figura 8.



**Figura 8 – Cromatograma de hemoglobinas.**

Quando as bandas aparecem como as da figura 8 é apresentado ao clínico se solicitado na requisição a hemoglobina alterada e o seu valor percentual, acabando assim o estudo por aqui.

No entanto se houver um pico anormal por exemplo depois do pico da HbA<sub>2</sub> poderemos estar perante, por exemplo, uma HbS ou uma HbC tal como mostra a figura 9.



**Figura 9 – Detecção de hemoglobinas em função do tempo de retenção.**

Assim, sempre que o equipamento mostre um cromatograma com picos que o próprio sistema automático não reconheça ou em tempos de retenção que possam corresponder a hemoglobinas anormais recorre-se à eletroforese em meio ácido ou em meio alcalino (kit Hydragel) para detetar a hemoglobina em questão. A deteção da hemoglobina por eletroforese consiste na aplicação de um campo elétrico sendo separadas consoante a sua carga.

Eletroforese em meio alcalino – há migração de quatro bandas: a menos migratória pode conter HbA<sub>2</sub>, HbC, HbE e HbO; a banda seguinte é onde migra a HbS, HbD, HbG e a Hb de Lapore; na 3ª aparece a HbF e na 4ª a HbA. Assim, e com ajuda do cromatograma permite a separação das HbC da HbS, da Hb D da HbA<sub>2</sub>.

Eletroforese em meio ácido – há migração de cinco bandas: a 1ª correspondente à HbF; a 2ª correspondente à HbA, HbA<sub>2</sub>, HbD, HbE, HbG e Hb de Lapore; a 3ª correspondente a HbS; a 4ª à Hb O e a 5ª a HbC. Assim, esta eletroforese permite a distinção da HbS da Hb de Lepore e da Hb O da HbC.

Se, o estudo não se tornar conclusivo as amostras são enviadas ao laboratório de Biologia Molecular do Centro Hospitalar de Coimbra para a realização de estudos moleculares.

## **Estudo dos glóbulos rubros**

### **Doseamento da glucose-6-fosfato desidrogenase**

O cromossoma X é responsável pelo transporte do gene da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), na sua ausência ou mutação, e como é um gene ligado ao sexo o

homem fica deficiente na enzima enquanto a mulher tendo só um alelo ausente ou mutado é apenas portadora dessa deficiência.

É uma enzima que reduz o NADPH enquanto oxida a glucose-6-fosfato sendo este NADPH necessário para a produção de glutathione reduzida. A deficiência nesta enzima leva a que a glutathione permaneça oxidada e não desempenhe o seu papel como agente antioxidante, ficando o eritrócito sujeito a *stress* oxidativo.

Assim sendo, o doseamento da G6PD faz-se de forma indireta através do doseamento do NADPH por espectrofotometria, medindo o aumento da absorvância a 340 nm.

Esta deficiência está presente em todas as células, é normalmente assintomática e casos de anemia hemolítica aguda são comuns, no entanto é autolimitada dado à renovação de eritrócitos (1).

### **Doseamento da haptoglobina**

A haptoglobina é uma proteína existente no plasma cuja função é ligar-se à hemoglobina proveniente da lise dos eritrócitos. Se a proteína se encontrar diminuída no plasma significa que esta se ligou à hemoglobina e o complexo haptoglobina-hemoglobina está a ser removido de circulação, indicando a ocorrência de hemólise intravascular.

Para o doseamento desta proteína usa-se um ensaio de imunodifusão onde a haptoglobina funciona como um antígeno que se vai ligar a um anticorpo impregnado no gel, sendo a difusão tanto maior quanto a concentração da haptoglobina presente. O halo de difusão deve ser lido ao fim de 18/24h em milímetros e, para valores <4mm já se considera hemólise intravascular (3).

### **Teste da solubilidade**

O teste da solubilidade é um teste rápido, qualitativo, usado quando existe a suspeita que na amostra em questão existe HbS. Este teste baseia-se na relativa insolubilidade desta hemoglobina quando combinada com um agente redutor assim, a amostra apresenta-se turva em 15 minutos e, quando o tubo de ensaio é colocado num suporte, as linhas auxiliares de visualização nele presente, não se visualizam. Amostras sem esta hemoglobina são solúveis aparecendo transparentes.

### **Teste da fragilidade osmótica**

Este teste avalia o grau de hemólise dos eritrócitos quando sujeitos a soluções salinas hipotónicas tamponadas, sendo um importante rastreio no diagnóstico da esferocitose hereditária, uma vez que os esferócitos têm a relação superfície/volume diminuída, resultando assim num aumento da hemólise.

O teste consiste em soluções de concentrações decrescentes de cloreto de sódio tamponado [9 a 0 g/dL] as quais são adicionados um pequeno volume de sangue (50µL), centrifugados. Posteriormente é efectuada a leitura num espectrofotómetro a 540nm.

O grau de hemólise é obtido comparando a absorvência do tubo face ao tubo que não tem solução, sendo os resultados posteriormente expressos em percentagem expressos graficamente (3).

### **Teste de Kleihauer**

O teste baseia-se na resistência que a hemoglobina F tem à eluição ácida quando comparada com outras hemoglobinas, como tal os esfregaços de sangue periférico após fixação são submetido a uma solução de citrato (pH 3.3) e corados por hematoxilina ácida. Na visualização do esfregaços é possível visualizar eritrócitos que coram de rosa (contém hemoglobina F) e, eritrócitos descorados (contém hemoglobina normal, não resistente à solução ácida).

Este teste pode ser usado no diagnóstico diferencial da resistência hereditária da hemoglobina fetal (todos os eritrócitos vão aparecer corados porque todos eles contem HbF), em casos de talassemia (alguns eritrócitos aparecem corados) e na gravidez para deteção de eritrócitos fetais em circulação ou em hemorragias transplacentárias (3).

## **Controlo de qualidade**

Todos os testes e equipamentos usam controlos de qualidade internos fornecidos pelas casas comerciais ou amostras com resultados previamente conhecidos. Mensalmente, são realizados controlos de qualidade externos do programa UK-NEQAS para os equipamentos ADVIA 2120 e Variant II.

## Microbiologia

A palavra microbiologia deriva do grego “*mikros, bios e logia*” representando assim o estudo da vida de microrganismos. Esta, é uma ciência multidisciplinar que engloba diversas áreas como a Bacteriologia, a Virologia, Parasitologia, Imunologia e a Biologia Molecular.

Nesta seção será desenvolvido tudo o que pude fazer e observar durante o meu estágio neste serviço. Primeiramente, explicando, as técnicas usadas para observação microscópica, seguido da descrição dos meios de cultura para que, na análise das amostras, não tenha de referir consecutivamente para que serve cada meio. Por fim, é apresentado as possíveis diferentes formas possíveis de identificação e suscetibilidade disponíveis.

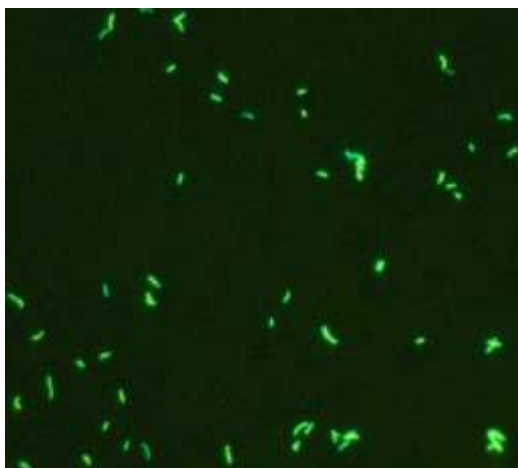
### Técnicas para observação microscópica

As técnicas para observação microscópica englobam preparações a fresco e técnicas de coloração.

A coloração de Gram permite diferenciar as bactérias Gram positivas, que coram de roxo, das Gram negativas, que coram de rosa. Estas duas colorações devem-se à estrutura da parede bacteriana uma vez que as Gram positivas, devido à abundância de peptidoglicano á existente na parede celular das bactérias, o corante (violeta de cristal) fica retido neste e o diferenciador não atua. O mesmo não acontece nas Gram negativas que, devido à pequena camada de peptidoglicano, o diferenciador atua e liberta o primeiro corante e a coloração resulta do segundo corante, a fucsina diluída (6).

A coloração de Zielh-Neelsen é usada para a visualização das bactérias ácido-álcool-resistentes, as micobactérias. Estas têm na sua parede uma grande quantidade de ácidos micólicos e arabinoglicano, conferindo uma baixa permeabilidade à coloração de Gram. Assim sendo, a amostra tem de ser aquecida para que os ácidos micólicos fluidifiquem e o corante possa atuar.

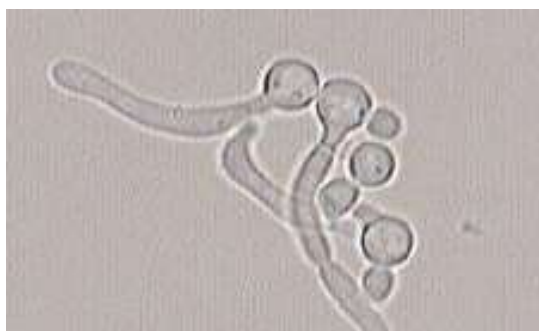
A coloração de Auramina (Figura 10) também é usada para a coloração das micobactérias onde o corante é um fluorocromo que se liga ao ácido micólico existente nas suas paredes e, em microscopia de fluorescência, observam-se bacilos esverdeados brilhantes num fundo escuro. Esta coloração oferece uma maior sensibilidade que a coloração de Zielh-Neelsen.



**Figura 10 – Coloração de Auramina.**

A coloração de Kinyoun (coloração de Zielh- Neelsen modificada) é usada no CHP para a pesquisa de ooquistos de *Cryptosporidium* spp, devido às suas características ácidas.

Para a pesquisa de fungos usam-se: a coloração de azul de lactofenol, a coloração de tinta-da-china e o teste da blastese. A coloração de azul de lactofenol permite a visualização do micélio aéreo (hifas e esporos) dos fungos filamentosos. A coloração com tinta-da-china permite a visualização dos polissacarídeos capsulares de *Cryptococcus neoformans* por contraste negativo onde, a cápsula aparece transparente em volta do fungo contra o fundo negro (da tinta). E, também, para a pesquisa de fungos leveduriformes existe o teste da blastese que não se trata de uma coloração mas sim de uma preparação a fresco realizada em soro que permite observar se ocorre formação de tubos germinativos (Figura 11) ao fim de 2 a 4 horas de incubação, sendo esta uma prova de identificação presuntiva de *Candida albicans* (6).



**Figura 11 – Teste da blastese com formação de tubos germinativos.**

## Meios de Cultura

Na tabela 3 são apresentados os meios de cultura e enriquecimento utilizados durante a realização deste estágio, referindo também a sua composição e finalidade (7).

**Tabela 3 – Meios de cultura**

Meio de Cultura	Composição	Finalidade
<b>MacConkey</b>	Meio base peptonado com lactose, onde as bactérias gram positivas são inibidas pelo violeta de cristal e pelos sais biliares. O vermelho neutro é o indicador de pH.	Diferencia bacilos fermentadores ( <i>Escherichia coli</i> ) dos não fermentadores ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ).
<b>MacConkey Sorbitol agar</b>	Tem o mesmo meio base que a gelose de MacConkey no entanto a lactose é substituída por D-sorbitol.	Para a diferenciação e seleção de <i>E.coli</i> O157:H7 em amostras fecais.
<b>Gelose de Chocolate- PVX</b>	Meio peptonado base enriquecido com uma solução de 2% de hemoglobina e PolyviteX.	Permite o crescimento de microrganismos fastidiosos como o <i>Haemophilus</i> spp. e <i>Neisseria</i> spp..
<b>Salmonella-Shigella agar -SS</b>	Meio peptonado base com: lactose, citrato férrico e tiosulfato de sódio. Vermelho neutro é o indicador de pH. Ocorre a inibição dos coliformes através dos sais biliares e do verde brilhante.	Seletivo para a <i>Salmonella</i> spp. e algumas <i>Shigella</i> spp. que aparecem transparentes (não fermentadoras) face às fermentadoras de lactose que adquirem a tonalidade rosa.
<b>Agar de cisteína lactose deficiente em eletrólitos – CLED</b>	Meio pobre em electrólitos que tem o azul de bromotimol como indicador de pH permitindo diferenciar os fermentadores dos não fermentadores da lactose.	Usado, geralmente, para amostras urinárias, impedindo a proliferação de <i>Proteus</i> spp.

**Tabela 3 – Meios de cultura (cont.)**

Meio de Cultura	Composição	Finalidade
Gelose de sangue – COS	Meio peptonado base com 5% de sangue de carneiro.	Meio diferencial (bactérias Gram positivas pela observação da existência ou não de hemólise) não seletivo que permite também o crescimento de microrganismos fastidiosos.
Campylosel	Meio com sangue de carneiro que facilita o crescimento de microrganismos específicos e, contém antibióticos (vancomicina, trimetoprim, polimixina B, anfotericina B e cefalotina) que inibem alguns contaminantes.	Meio seletivo para <i>Campylobacter</i> spp..
Buffered charcoal yeast extract – BCYE	Constituído por estrato de levedura, agar, carvão vegetal, sais e suplementado com L-cisteína, $\alpha$ -cetoglutarato e pirofosfato férrico.	Meio enriquecido para <i>Legionella</i> spp., mas onde também crescem <i>Francisella</i> spp. e <i>Nocardia</i> spp..
BCYE com antibióticos	Meio do BCYE com adição de antibióticos (polimixina B, vancomicina e ansamicina).	Enriquecido e seletivo para <i>Legionella</i> spp..
Middlebrook 7H9 modificado – Tubo MGIT	Constituído por 7ml do meio Middlebrook 7H9 modificado e por um suplemento de antibióticos (PANTA).	Utilizado pelo BACTEC MGIT 960 para a detecção de micobactérias. Esta é realizada através da diminuição do oxigênio pela emissão de fluorescência.
Lowenstein-Jensen	O meio é constituído por ovos inteiros coagulados, sais definidos, glicerol e fécula de batata.	Meio específico para <i>Mycobacterium</i> spp..



**Tabela 3 – Meios de cultura (cont.)**

Meio de Cultura	Composição	Finalidade
Caldo de Carne	Carne e meio base peptonado.	O meio permite a recuperação de microrganismos, como é o caso de microrganismos anaeróbios.
Sabouraud	Meio com glucose, peptonas e pH ligeiramente ácido favorece o crescimento de fungos face ao crescimento bacteriano.	Usado para a culturas de fungos.
Müller-Hinton E – MHE	Meio contém amido, caseína, agar e infusão de carne.	Meio destinado à realização de testes de suscetibilidade de microrganismos não fastidiosos.
Müller-Hinton Fastidious – MHF	Para além do meio base contém 5% de sangue de carneiro e 20mg/L de $\beta$ -NAD.	Meio destinado à realização de testes de susceptibilidade de microrganismos fastidiosos.
Garrafas BACTEC	Caldo nutritivo (especifico para cada tipo de garrafa), anticoagulante, penicilinas e resinas.	Meio líquido para deteção de bactérias (aeróbia, anaeróbias e micobactérias) e fungos em fluidos biológicos.
Gelose Cedsulodina, Irgasan e Novobiocina – CIN	Meio peptonado com extrato de levedura, manitol e sais biliares. Suplementado com antibióticos (novobiocina, cefsulodina e irgasan). Como indicador de pH usa o vermelho neutro e o violeta de cristal.	Meio seletivo para o isolamento de <i>Yersinia</i> spp..

## **Amostras biológicas**

As seguintes amostras estão apresentadas sob a forma de pedidos mais frequentes não sendo, o conteúdo apresentado o único processamento que o produto tem. Um exemplo específico disso é a pesquisa de micobactéria que de grosso modo se pesquisa no aspirado bronco-alveolar mas que também pode ser pesquisado na urina, LCR, fezes, lavado bronco-alveolar e expetoração.

### **Urina**

#### **Urocultura**

É um líquido biológico estéril que pode ser contaminado com bactérias saprófitas que ascendem à uretra, sendo estas arrastadas aquando da micção. O exame microbiológico serve para determinar a sua presença, sendo mais frequente a infeção em mulheres do que em homens devido ao menor comprimento da uretra e à ausência dos fluídos prostáticos.

As Enterobacteriaceae, em particular a *Escherichia coli*, destacam-se em infeções urinárias em crianças e adultos que não tenham outra patologia associadas. Já a nível hospitalar o leque de microrganismos infecciosos aumenta uma vez que o pedido de urocultura tem como fonte doentes algaliados e/ou com outras patologias do aparelho urinário associadas (como por exemplo um transplantado renal), sendo os mais frequentes *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp., fungos leveduriformes (*Candida* spp.), Enterococcus spp. e *Proteus* spp.(8).

Em mulheres jovens depois da *E.coli* o segundo maior causador de infeções urinárias é o *Staphylococcus saprophyticus* (9). Em mulheres grávidas é importante o despiste do *Streptococcus agalactiae* que, embora seja colonizante, pode tornar-se responsável por infeções do trato urinário, amnionite, endometrite e bacteriémia e em recém-nascidos pode provocar infeções sistémicas ou focalizadas, como meningites e pneumonias, respetivamente (10).

### **Colheita**

Pode ser efetuada pelo próprio doente através da recolha do jato intermédio da primeira urina da manhã ou a nível hospitalar pela punção do cateter urinário, drenagem de nefrostomia, punção supra-púbica (caso se pretenda uma colheita asséptica) e o saco coletor que é usado em recém-nascidos e crianças pequenas, devendo ser mudado de hora a hora.

### Processamento laboratorial

- Observa-se o sedimento urinário para avaliar a existência de resposta inflamatória (este passo é efetuado na Química Clínica);
- Coloração de Gram;
- Inocula-se por sementeira quantitativa em CLED e PVX, com exceção da ginecologia e obstetrícia que se inocula em COS e CLED.

Durante o processo de triagem das amostras é necessário ter em consideração se já está a ser instituída antibióterapia, caso esteja, a inoculação das placas deve ser feita com uma ança calibrada de 10µL na tentativa de conseguir recuperar algum microrganismo. Nas amostras sem antibióterapia é usada uma ança de 1µL.

### Interpretação

A gelose de chocolate sendo um meio enriquecido permite o crescimento de todos os microrganismos, incluindo o *Proteus* spp, que vai difundir-se neste meio e mascarar outras culturas microbianas por esta mesma razão é que se usa em paralelo o CLED, dada a sua baixa concentração de eletrólitos o swarming do *Proteus* spp. é inibida/minimizada.

A valorização dos resultados obtidos é feita em função da contagem e tipo de bactérias em cultura (mono ou polimicrobiana e respetivas UFC/mL – tabela 4) e, com o observado na análise do sedimento (número de leucócitos, células epiteliais, glóbulos rubros, cilindros e cristais) (11).

**Tabela 4 – Critérios para validação de uroculturas para amostras do jato intermédio.**

Contagem de colónias (UFC/mL)	Critério
$<10^2$	Amostra negativa
$10^2-10^3$	Se sedimento não está alterado é provável contaminação. Se houver leucocitúria ou eritrocitúria deve suspeitar-se de micobactérias
$>10^3$	3 ou mais uropatógenos: contaminação
$\geq 10^2$ e $\leq 10^5$	1 ou 2 uropatógenos em pequena quantidade – identificação e suscetibilidade sempre que a clínica o exigir
$\geq 10^5$	1 ou 2 uropatógenos indicativo de infeção urinária

Em suma, as culturas de amostras do jato intermédio com 3 ou mais colónias diferentes devem ser dadas como negativas, devido a contaminação. Contudo em amostras da aspiração supra-pública os microrganismos são de valorizar visto tratar-se de uma colheita asséptica.

Também de acordo com o aspeto macroscópico das colónias, cheiro e com recurso a algumas provas de identificação rápidas pode-se proceder a uma identificação presuntiva, como por exemplo, quando temos uma colónia amarela (no CLED), não mucoide, faz-se o teste do indol, se este for positivo há uma identificação presuntiva de *E.coli* e, se negativo para *Klebsiella* spp, com exceção da *K. oxytoca* (indol positivo). Dos microrganismos descritos acima, em CLED, a *E.coli* apresenta colónias amarelas, opacas e o meio muda para amarelo; o *S. aureus* apresenta colónias amarelas escuras e o meio fica amarelo; a *Klebsiella* spp. e o *Enterobacter* spp. apresenta colónias amarelas a azuis, por vezes mucoides com fermentação do meio (amarelo); os microrganismos não fermentadores são o *Proteus* spp. e a *Pseudomonas* spp. que, diferem no aspeto da colónia, uma tem colónias azuis ou transparentes e a outra tem colónias esverdeadas de contorno irregular, respetivamente. No despiste do *Streptococcus agalactiae* observa-se a  $\beta$ -hemólise na COS, característica deste microrganismo.

### **Ensaio imunocromatográfico**

Os ensaios imunocromatográficos realizados na urina são testes de pesquisa de antígenos de *Streptococcus pneumoniae* e *Legionella* spp.. Eles fornecem um método rápido e simples para o diagnóstico presuntivo de meningites e pneumonias causadas por estes dois agentes etiológicos.

Estes ensaios têm impregnado na membrana de nitrocelulose o anticorpo de coelho anti-bactéria e um anticorpo anti espécie, responsáveis pela linha de positividade e de controlo, respetivamente. Quando o antígeno estiver presente na amostra há a formação de um complexo anticorpo-antígeno.

### **Colheita**

Igual à colheita para a urocultura.

### **Procedimento laboratorial**

- Inocula-se o Kit BinaxNOW da Alere.

### Interpretação

Quando o teste apresentar unicamente a linha controlo indica que o teste foi realizado corretamente e que não houve deteção do antígeno, sendo assim um resultado presuntivo negativo. Se apresentar a linha de controlo e a linha de positividade o resultado é positivo mas, se só for visível a linha de positividade o teste é declarado como inválido e deve ser repetido. Numa amostra dita negativa a infeção não pode ser excluída uma vez que o antígeno presente na amostra pode ser inferior ao limite de deteção do teste.

### Sangue

O sangue tem duas principais ações no serviço de microbiologia, uma delas é a deteção microbiana e a outra é a pesquisa do Citomegalovírus (CMV).

#### **Hemocultura**

O sangue é um fluido estéril e qualquer microrganismo nele encontrado é considerado possível agente causador de infeção. Assim, a cultura de sangue, hemocultura, é realizada sempre que o clínico suspeite da presença de bactérias ou fungos na corrente sanguínea.

Numa hemocultura valoriza-se microrganismos associados a outras patologias, como por exemplo o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e membros da família Enterobacteriaceae. Por outro lado os contaminantes estão associados a bactérias da flora cutânea inerentes a inadequada assepsia da pele.

### Colheita

Sangue colhido por punção venosa para garrafa de hemocultura. 8-10mL para adultos e 1-3mL para pediatria, devendo sempre no mínimo, ser colhido pelo menos 2 garrafas de membros diferentes. As garrafas BACTEC têm diferentes cores consoante o que se pretende analisar, sendo azul para aeróbios e fungos, vermelha para micobactérias, roxa para anaeróbios e cinzenta para pediatria.

### Procedimento

- Colheita direta do sangue para as garrafas e incubação no BD BACTEC FX.

### Interpretação

Esta cultura é feita em meios líquidos enriquecidos, garrafas BACTEC, que posteriormente são incubadas no BD BACTEC FX. O crescimento por parte do microrganismo liberta CO<sub>2</sub> que ao reagir com um corante fluorescente existente no fundo da garrafa, emite fluorescência sendo esta detetada pelo foto-detetor que através de um sinal sonoro ou luminoso alerta o utilizador da existência de crescimento (11).

O tempo normal de incubação são de 7 dias para culturas de garrafas de aeróbios e fungos, anaeróbios, de pediatria e, de 42 dias para garrafas de micobactérias. No entanto, o tempo de incubação das hemoculturas podem ser prolongado em situações de febre de origem indeterminada, endocardites, infeções profundas ou suspeita de algumas bactérias, como é o caso da *Brucella* spp..

Quando as culturas indicam crescimento bacteriano é feito um esfregaço corado por Gram e inoculação em PVX para posterior identificação e teste de susceptibilidade, o resultado preliminar da coloração é dada ao clínico. No caso da cultura de fungos mesmo que esta não positive ao fim dos 7 dias procede-se a uma sementeira cega, ou seja inocula-se em gelose Sabouraud e aguarda-se durante 30 dias.

Quando o doente se encontra catetizado, é importante o envio do cateter para ver se a septicémia teve início neste, por comparação da cultura do cateter em gelose de sangue com a hemocultura.

### **Pesquisa do antígeno do Citomegalovírus**

O Citomegalovírus não causa doença em indivíduos saudáveis mas em indivíduos com infeção por HIV e em transplantados é patogénico.

A pesquisa do antígeno ocorre por imunofluorescência indireta permitindo a rápida deteção do antígeno em neutrófilos do sangue periférico, para tal são usados dois anticorpos monoclonais (um dirigido para o alvo e um segundo anticorpo responsável pela fluorescência) que reconhecem a proteína quinase pp65 (proteína estrutural da matriz) presente nos neutrófilos (12).

### Colheita

Colher 3-5 mL de sangue venoso para tubo com EDTA.

### Processamento

- Preparação de lâminas, fixação, permeabilização e coloração.

### Interpretação

A leitura deve ser realizada o mais rápido possível para evitar a perda de fluorescência. As células infetadas pelo CMV apresentam o núcleo corado de verde face as negativas não apresentam coloração no entanto a leitura pode tornar-se ambígua devido à presença de artefactos.

A amostra é considerada negativa se nos dois esfregaços (cada um com o mínimo de 5000 células) não se visualizarem células coradas e para ser considerada positiva basta apenas uma célula ser positiva, sendo necessário neste caso proceder à contagem das células positivas e expressar o valor de células positivas pelo valor total de células existentes. Podendo assim avaliar o aumento ou decréscimo de células em doentes com estudo anterior, monitorizando a doença.

### Exsudato orofaríngeo

Estes produtos são importantes para o diagnóstico bacteriológico e vírico de agente(s) patogénico(s) causador(es) de infeções do aparelho respiratório superior.

Em indivíduos saudáveis existem vários microrganismos potencialmente patogénicos como o *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, leveduras e Enterobacteriaceae que, podem colonizar a orofaringe mas que raramente causam infeção.

Geralmente este produto é enviado ao serviço de Microbiologia para o despiste de faringites por *Streptococcus* do grupo A (*S. pyogenes*), mas pode ser enviado em menor frequência para despiste de faringites por *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Mycoplasma pneumoniae*.

### Colheita

Exsudato orofaríngeo em zaragatoa com meio de transporte, em caso de suspeita de *N. gonorrhoeae* o transporte deverá ser feito em meio de Amies com carvão.

### Procedimento

- Inocula-se o caldo Todd Hewitt e, subcultiva-se para COS (pesquisa de *Streptococcus* grupo A);
- Inocula-se COS e PVX para as restantes, quando solicitado pelo clínico.

### Interpretação

Se as colónias forem sugestivas de um *Streptococcus pyogenes*, colónias  $\beta$ -hemolíticas, a sua identificação é feita pelo teste de difusão com bacitracina (sensível) e cotrimoxazol (resistente) e PYR positivo. Seguindo posteriormente para testes de suscetibilidade.

### **Vírus Sincicial Respiratório**

Este vírus é responsável por doenças respiratórias em todas as idades contudo, é mais frequente em crianças com menos de 4 anos de idade, sendo que pode causar complicações graves como pneumonia e bronquiolite (6).

Para a deteção é usado um ensaio imunocromatográfico, onde na membrana tem impregnado um anticorpo contra um epítipo da proteína F do vírus e ainda possui outro anticorpo conjugado com partículas de ouro (anticorpo conjugado) direcionado também ele para um epítipo da proteína F. Após a formação do complexo conjugado-vírus ele percorre a membrana e vai ser adsorvido pelo anticorpo impregnado na membrana e assim aparecer a banda de positividade. O ensaio para ser positivo tem de ter a linha de teste e de controlo positiva.

### **Expetoração, Lavado e Aspirado Bronco-alveolar**

A expetoração, o lavado e o aspirado bronco-alveolar são produtos que são provenientes e representativos do trato respiratório inferior, onde as principais infeções são de origem vírica e bacteriana.

A nível bacteriano entre os agentes patogénicos responsáveis pelas infeções destacam-se o *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* em pneumonias adquiridas na comunidade. Em pneumonias nosocomiais destacam-se os bacilos Gram negativos, entre os quais os mais frequentes encontra-se a *Pseudomonas aeruginosa*, a *Klebsiella* spp. e a *Escherichia coli*. As infeções provocadas por *Staphylococcus aureus* também são comuns após uma infeção vírica pelo Influenza (6). A *Legionella* spp., agente etiológico da doença do legionário, é responsável por pneumonias adquiridas na comunidade.

Para além dos agentes patogénicos causadores de pneumonias, as amostras do aparelho respiratório inferior são também utilizadas para o despiste de *Mycobacterium* spp. que, ainda hoje, é um problema de saúde pública com especial atenção em indivíduos imunodeprimidos.



Existem também patologias pulmonares graves causadas por fungos, como é o caso da aspergilose provocada pelo *Aspergillus* spp., que ocorre primariamente em doentes com severas imunodeficiências (13). O *Pneumocystis jirovecii* também é comum em doentes imunocomprometidos, principalmente em doentes com infeção por HIV.

### **Expetoração**

Permite a identificação de agentes patogénicos responsáveis por quadros de infeção pulmonar, em especial a pneumonia.

### Colheita

Realizada preferencialmente de manhã, pelo próprio, para um recipiente estéril após higienização oral. No caso de crianças ou doentes que não consigam expetorar, esta é induzida por nebulização com soro fisiológico.

### Procedimento

- Coloração de Gram, para ver se existe contaminação com a flora da orofaringe;
- Inocula-se geloses de PVX, COS e MacConkey.

### Interpretação

Antes da inoculação em placa a amostra tem de ser avaliada quanto à sua qualidade através da observação do esfregaço corado por Gram que, tem de satisfazer os critérios aceitabilidade propostos por Murray e Washington, apresentados na tabela 5 (14).

**Tabela 5 – Critérios de aceitabilidade de Murray e Washington.**

Número de células epiteliais	Número de leucócitos	Qualidade da amostra
<10 células por campo	>25	Boa
10-25	>25	Boa
>25	<10	Má
>25	10-25	Má
>25	>25	Má

Como ilustra a tabela uma amostra para ser considerada boa terá a menor contaminação possível do trato respiratório superior logo, terá o menor número de células epiteliais e maior número de leucócitos por campo em 10 campos. No entanto, estes critérios não deverão ser aplicados em doentes leucopénicos.

A interpretação do crescimento microbiano tem de ser conjugada com o observado no esfregaço. Quando realizado um esfregaço diretamente da amostra se observar-se bactérias Gram positivas com agrupamentos em cadeia suspeita-se de um *Streptococcus* spp. que em cultura apresenta hemólise em COS, se tratar-se de uma  $\alpha$ -hemólise temos identificação presuntiva de ser *Streptococcus pneumoniae*.

No caso de uma infeção por *Haemophilus* spp. o esfregaço é bastante indicativo devido a existência de cocobacilos Gram negativos que irão formar colónias unicamente em PVX devido a necessidade em NAD e hemina (fator V e X), sendo estes essenciais para a identificação da espécie. A prova de satelitismo é realizada pra distinguir as duas grandes espécies que causam patologias pulmonares, o *Haemophilus influenzae* que necessita de ambos os fatores para crescer e o *Haemophilus parainfluenzae* que necessita apenas do fator V, podendo desenvolver-se em COS (6).

A *Moraxella catarrhalis* é um diplococo Gram negativo que como já referi é um dos agentes etiológicos mais frequentes nas pneumonias, apresentando colónias opacas, redondas e não hemolíticas em COS (15).

Devido ao aumento das resistências a nível dos microrganismos adquiridos em ambiente hospitalar torna-se importantíssimo a realização de testes de suscetibilidade com o intuito de averiguar possíveis multirresistências.

### **Lavado Broncoalveolar**

O lavado broncoalveolar corresponde a uma amostra de secreções dos bronquíolos distais e alveolares. No CHP a sua principal indicação é o diagnóstico de pneumonia em imunodeprimidos, pneumonia nosocomial associada ao ventilador e a pneumonia adquirida na comunidade.

#### Colheita

Por broncofibroscopia, sendo o produto colocado num tubo estéril fechado.

#### Procedimento:

- Realiza-se um citoesfregaço (2000 rpm/5 minutos) com coloração de Gram;
- Citoesfregaço para pesquisa de *Pneumocystis jirovecii* (900 rpm/5 minutos);

- Inocula-se placas de PVX, COS e MacConkey, com sementeira quantitativa;
- Se solicitado a pesquisa de fungos ou *Legionella* spp, inocula-se placa de Sabouraud (sementeira semi-quantitativa) e BCYE + BCYE com antibióticos (sementeira quantitativa), respectivamente;
- Se solicitado micobactérias, inocular meios apropriados (Lowenstein Jensen e MGIT).

### Interpretação

O que foi referido na interpretação da expetoração aplica-se também a este produto, com a exceção que no lavado a determinação da qualidade da amostra pelo esfregaço não é tão importante uma vez que há uma menor probabilidade de contaminação com flora da orofaringe devido à sua técnica de colheita.

### **Aspirado Boncoalveolar**

O aspirado bronco-alveolar representa uma amostra de secreções dos bronquíolos distais, servindo de diagnóstico a pneumonias (nosocomial e adquirida na comunidade) provocadas essencialmente por micobactérias (bacilos ácido álcool resistentes).

As *Mycobacterium* spp. não se pesquisam exclusivamente neste produto, podendo ser pesquisado no LCR, urina, entre outros. Como é o produto com mais pedidos para a sua pesquisa é oportuno o seu enquadramento nesta seção.

### Colheita

Por broncofibroscopia, sendo o produto colocado num tubo estéril fechado.

### Procedimento

- Coloração de Ziehl-Neelsen e/ou Auramina;
- Descontamina-se e concentra-se da amostra;
- Inocula-se em meio Lowenstein Jensen e MGIT.

### Interpretação

As micobactérias têm um crescimento lento, daí surgir a necessidade de meios seletivos que eliminem flora microbiana que possa ainda existir depois da descontaminação. Como são bactérias de crescimento lento o exame cultural só poderá ser considerado negativo após 56 dias de incubação.

O BACTEC MIGHT 960 faz a incubação do meio líquido MGIT, permitindo um crescimento mais célere, sendo este detetado pelo consumo do oxigénio existente no tubo e, consequente emissão de fluorescência (16). Quando o equipamento sinaliza uma cultura como positiva, esta terá de ser confirmada pelo esfregaço corado por Ziehl-Nielsen (os bacilos ácido-álcool-resistentes formam cordões) e subcultura em PVX (serve de exclusão a contaminações). As culturas em Lowenstein Jensen face ao meio MGIT permitem a observação da morfologia das colónias. As culturas são posteriormente reencaminhadas para Biologia Molecular para efetuarem estudos de identificação e de suscetibilidade.

Quando existe uma forte suspeita da presença de micobactérias o clínico pode pedir um teste rápido para despiste de *Mycobacterium tuberculosis* através da análise no GeneXpert. Esta análise baseia-se numa reação de PCR que vai amplificar uma parte do genoma bacteriano e assim permitir observar o grau de deteção. Em paralelo o equipamento faz o teste de resistência à rifampicina (antibiótico usado no tratamento cujas resistências tem vindo a aumentar), ou seja, vai amplificar a região mutante responsável pela resistência, *rpoB* da RNA polimerase (17).

Qualquer informação de positividade, seja no exame direto ou cultural, o clínico responsável é imediatamente notificado pelo Microbiologista clínico.

## **LCR**

O líquido cefalorraquidiano é um fluido estéril e incolor que preenche o espaço subaracnóide do cérebro e espinal medula.

Os sinais clínicos do doente como febre, dores de cabeça e rigidez da nuca fazem o clínico suspeitar de uma meningite, podendo ser de origem bacteriana, fúngica ou parasitológica.

As meningites bacterianas agudas são as infeções mais frequentes, sendo comum encontrar *Neisseria meningitidis* em crianças, *Streptococcus pneumoniae* em adultos, *Mycobacterium tuberculosis* em imunodeprimidos e bacilos Gram negativo em idosos. Já a nível fúngico o *Cryptococcus neoformans* e *Coccidioides immitis* são os mais comuns.

## **Colheita**

Realizada por punção lombar, sendo um método invasivo (ato médico).

### Procedimento laboratorial

- Realiza-se um citoesfregaço corado por Gram;
- Inocula-se com sementeira em gota de uma placa de COS e PVX, com leitura as 24h e caso negativo reincuba-se mais 24h;
- Se o clínico suspeitar de uma infeção por micobactérias terá de requisitar essa informação ao laboratório.

### Interpretação

As infeções provocadas por estes agentes são graves e, face à localização da infeção e aos possíveis patogénicos presentes, a amostra requer um processamento rápido.

Como o fluido é estéril qualquer microrganismo que possa crescer nos meios de cultura deverá ser considerado como possível patogénico, devendo proceder-se à identificação e realização de testes de suscetibilidade.

### Fezes

Nas fezes há uma enorme variedade de microrganismos, quer não patogénicos quer patogénicos, onde estes últimos são responsáveis pelas infeções no aparelho gastrointestinal, podendo ser de origem bacteriana, parasitológica ou viral.

Assim sendo é imprescindível que o clínico faça um pedido direcionado de acordo com a história e avaliação clínica, exame físico, história de ingestão de alimentos e viagens recentes.

As infeções do trato gastrointestinal com etiologia microbiológica caracterizam-se por diarreias (pastosas ou aquosas), gastroenterites, intoxicações alimentares e em casos mais graves disenteria e colites hemorrágicas.

O aspeto macroscópico das fezes e a clínica do doente tem um importante valor na escolha, pelo Patologista, de qual a análise a ser realizada em primeiro lugar, por exemplo se as fezes forem líquidas irá ser feito, primeiramente, a pesquisa do antígeno do *Clostridium difficile*.

### **Coprocultura**

A cultura das fezes em meios sólidos designa-se por coprocultura e, tem o propósito de permitir diferenciar os agentes patogénicos dos não patogénicos.

A *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Escherichia coli* em particular o serotipo O157:H7 são as bactérias pesquisadas por rotina aquando o pedido de coprocultura.

### Colheita

Colheita de um pequeno volume de fezes para um recipiente estéril.

### Procedimento

- Observa-se o esfregaço corado por Gram;
- Inocula-se placas de MacConkey, MacConkey Sorbitol, SS, CIN, Campylosel e o caldo líquido GN (incuba 4h a 37°C sendo repicado para SS ou MacConkey).

### Interpretação

A interpretação do exame cultural ocorre através dos processos fermentativos dos hidratos de carbono dos meios de cultura e de precipitação de agentes dissolvidos no meio (como é o caso do tiosulfato férrico em SS), assim combinando estas formas poderemos obter uma identificação presuntiva dos microrganismos patogénicos. Assim, obteremos espécies não fermentadoras de lactose e de sorbitol no MacConkey (*Salmonella* spp.) e MacConkey Sorbitol (*E.coli* O157:H7), respetivamente., colónias fermentadores de manitol no CIN (*Yersinia* spp.), e colónias não fermentadoras de lactose em SS (*Salmonella* spp. tem o centro negro face a *Shigella* spp. que é translúcida).

### **Exame parasitológico**

O exame parasitológico destina-se à pesquisa de estruturas parasitárias (ovos, cistos, trofozoítos e seres adultos) permitindo o diagnóstico do agente etiológico responsável pela infeção.

Hoje em dia as parasitoses intestinais têm vindo a diminuir não só devido ao melhoramento das condições sanitárias como à maior sensibilização para boas práticas de higiene. No entanto, no CHP ainda se encontram alguns casos de giardíase (*Giardia lamblia*) em crianças, teníase (*Taenia solium* e *Taenia saginata*) e ascaríase (*Ascaris lumbricoides*).

### Colheita

Colheita de fezes de 3 dias não consecutivos para um recipiente estéril.

### Procedimento

- Observa-se um esfregaço com soluto de lugol ou a fresco após concentração;
- Realiza-se a coloração de Kinyoun para coccídeos intestinais (*Cryptosporidium* spp, *Isospora* spp. e *Cyclospora* spp.).

### Interpretação

Na ausência da visualização de estruturas parasitárias o resultado será enviado como negativo e, quando da sua observação (amostra positiva) são reportadas as estruturas observadas conjuntamente com o nome do parasita.

### **Ensaio imunocromatográficos**

Os ensaios imunocromatográficos usados nas fezes são para a pesquisa de *Helicobacter pylori*, Rotavírus e *Clostridium difficile*.

O rotavírus tem 7 serotipos (A a G) sendo que apenas o A, B e C infetam os Homens. O serotipo A é a causa mais comum de diarreia grave em crianças e o serotipo B e C provocam gastroenterites em adultos (18). O kit SD BIOLINE Rotavírus é um ensaio rápido em que apenas vai detetar vírus do serotipo A. O ensaio consiste na utilização de dois anticorpos numa imunocromatografia em sanduiche de fase solida, onde os anticorpos vão detetar as proteínas da cápside interna.

O *Clostridium difficile* é o agente etiológico mais frequente das colites pseudomembranosas associadas a ingestão de antibióticos que, vão destruir a flora bacteriana intestinal e permitir a proliferação de agentes patogénicos. Este, pode ter sequências genicas que codificam toxinas (estirpes toxinogénicas) responsáveis pela síntese de toxina A e B ou só B, no entanto é a toxina A que esta associada aos sinais clínicos. O C.DIFF QUICK CHEK COMPLETE utiliza anticorpos específicos para a deteção de glutamato desidrogenase (produzido por estirpes não toxinogénicas e toxinogénicas, se positivo confirma a presença do agente nas fezes) e toxinas A e B (se positivo confirma a presença de estirpes toxinogénicas). Um resultado positivo é confirmado por PCR no GeneXpert.

O *Helicobacter pylori* é o agente microbiano responsável por úlceras pépticas e gastrite crónica. O Pylori-strip é usado quando o paciente não pode ser submetido ao teste respiratório com ureia marcada, permitindo assim a deteção antigénio através dos anticorpos imobilizados na membrana de nitrocelulose (19).

### Colheita

Colheita de um pequeno volume de fezes para um recipiente estéril.

### Procedimento laboratorial

- Varia com cada kit.

### Interpretação

Os ensaios cromatográficos para serem validados têm que evidenciar a linha de controlo como positiva, se esta não for visível o ensaio deverá ser considerado inválido e terá de ser repetido novamente. Para ser positivo terá de ter a linha de controlo e a linha referente ao teste, se não houver o antígeno microbiano só aparecerá a linha de controlo.

### **Amostras purulentas**

As amostras purulentas podem advir de exsudatos de feridas superficiais, aspirados de feridas profundas e abscessos, líquidos de cavidades (pleural, ascítico, pericárdio, biliar, entre outros) e retalhos de tecidos, gânglios ou osso.

Face à diversidade de microrganismos implicados estão protocolados procedimentos gerais a seguir contudo, não se pode excluir metodologias mais específicas como é o caso do despiste de infeção por bactérias anaeróbias.

### Colheita

Deve ser o mais asséptica possível, devendo sempre que possível colher amostra das paredes dos abscessos/feridas, visto que na maioria das vezes o microrganismo multiplica-se neste local do que no centro do abscesso/ferida (6). Preferencialmente a amostra deve ser enviada em portagerm para preservar anaeróbios caso estejam presentes.

### Procedimento

- Esfregaço corado por Gram;
- Inocular: PVX, MacConkey e caldo carne;
- Para amostras de biliar além dos meios descritos acima inocular ainda COS e subcultivar em SS.



### Interpretação

O crescimento microbiológico em PVX e/ou em MacConkey não descarta uma infecção por bactérias anaeróbias estritas visto que, pode haver mais que um agente causador da infecção. Mas, se as geloses acima permanecerem estéreis (sem crescimento) e observar-se no esfregaço bactérias Gram positivas que não cresçam em aerobiose deve-se subcultivar o caldo de carne para meios de anaerobiose.

### Exsudato vaginal/uretral

Estes dois produtos permitem o diagnóstico de infecções do trato genital feminino e masculino.

Nas mulheres as infecções podem ocorrer por um simples desequilíbrio na flora saprófita, quer por bactérias sexualmente transmissíveis como a *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis* (ambas são os principais agentes etiológicos da cervicite), por fungos (*Candida spp.*) ou parasitas (*Trichomonas vaginalis*). Como já foi referido o *Streptococcus agalactiae* tem especial interesse nas mulheres grávidas.

Nos homens as infecções da uretra, uretrites, são muitas vezes assintomáticas, sendo mais prevalentes no homem do que na mulher, causadas principalmente por *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*.

### Colheita

Colheita do exsudato com zaragatoa. Para pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* deve ser em meio de transporte de Amies e para a pesquisa de *Chlamydia trachomatis* usa-se zaragatoa seca.

### Procedimento

- Esfregaço corado por Gram
- Esfregaço a fresco para visualização da *Trichomonas vaginalis*
- Grávidas: Inocular caldo Todd-Hewitt e subcultivá-lo em COS
- Inocula-se PVX, COS e Sabouraud

### Interpretação

A visualização do esfregaço permite inferir sobre o tipo de bactéria que poderemos ter, bactéria Gram positiva ou negativa. A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria intracelular

obrigatória e, por isso, não cresce em meios de cultura bacteriológica mas sim em culturas celulares devido à sua pouca resistência às condições ambientais é feito o estudo por Biologia Molecular por PCR.

Após identificação do microrganismo é feita suscetibilidade, sendo que no final do processo as espécies de *Neisseria gonorrhoeae* têm de ser reencaminhadas ao INSA para um estudo nacional de resistências.

## **Soro**

O soro é usado pelo sector da serologia para pesquisa ou determinação de anticorpos ou antígenos, por diferentes métodos como a ELISA, aglutinação, floculação, neutralização, entre outros. No entanto este sector não utiliza exclusivamente o soro havendo alguns testes que é usado o LCR (pesquisa de anticorpos anti Brucela e antígenos de *Cryptococcus neoformans*, por exemplo).

Nesta seção, irei apenas abordar as técnicas usadas no serviço que pude observar, não constituindo, por isso que o mesmo não possua outras metodologias.

### **Aglutinação**

O método de aglutinação pode ser qualitativo ou semi-quantitativo caso se determine um título por diluições sucessivas até que o resultado passe a ser negativo. Ele consiste na utilização de partículas latex com anticorpos ou antígenos impregnados que após a adição da amostra se estas contiverem antígenos ou anticorpos vão aglutinar. Sendo que a amostra é positiva quando se observa nitidamente a aglutinação (10).

São exemplos deste método a reação de Wright que determina a pesquisa de anticorpos anti-*Brucella* (responsáveis pela brucelose), a reação de Weil-Felix que pesquisa a presença de anticorpos anti-*Rickettsia cannavi* (responsável pela febre escarlatina nodular), entre outros.

### **Floculação**

O teste da reagina plasmática rápida (RPR) consiste na visualização de um precipitado acinzentado após a formação de um complexo entre a reagina (pesquisado) e as moléculas de colesterol revestidas com cardiolipina e carvão presentes no cartão do Kit. Estas reaginas são produzidas pelo *Treponema pallidum* no entanto, não são específicas desta bactéria. O VDRL é outro teste a usar a mesma metodologia mas como é um teste mais moroso (implica o aquecimento da amostra durante meia hora) e complexo, o laboratório opta por usar o RPR.

Quando há precipitação (teste positivo) são realizados testes mais sensíveis como a ELISA assim, este teste funciona como um rastreio rápido para detetar a presença de *Treponema pallidum*, agente etiológico da sífilis.

### **Neutralização**

O único teste de neutralização efetuado no serviço é a determinação semi-quantitativa de anticorpos anti-Dnase B. A Dnase B é uma proteína antigénica produzida pelo *Streptococcus pyogenes* (responsável por faringites e infeções cutâneas), este ensaio é preponderante no diagnóstico de infeções estreptocócicas cutâneas nas quais o título de anti-estreptolisina O não aumenta ou aumenta muitíssimo pouco.

O ensaio baseia-se na neutralização (bloqueio) da atividade despolimerizante da Dnase B pelos anticorpos presentes no soro, quando presentes perante um substrato. Quando existe neutralização do substrato observa-se coloração azul.

### **ELISA**

A técnica de Elisa consiste na utilização de tiras de microtitulação as quais estão revestidas pelo antigénio onde os anticorpos da amostra se vão ligar especificamente e, após uma lavagem, é adicionado o conjugado (IgM ou IgG) marcado com peroxidase e depois de outra lavagem é adicionado o substrato. Após incubação é adicionado o reagente de paragem e é lida a intensidade da coloração formada por fotometria no Mago 4 (aparelho automatizado que realiza a pipetagem, incubação e leitura de ELISA's).

## **Identificação**

### **Identificação manual**

Para a identificação manual existem provas que podem ser feitas para ajudar o microbiologista numa escolha mais adequada de cartas de suscetibilidade ou para a realização de uma identificação presuntiva. Seguidamente irei abordar as provas mais utilizadas no quotidiano no serviço (6).

- Prova da catalase: permite evidenciar a existência de microrganismos que possuam a enzima catalase pela decomposição do peróxido de hidrogénio e consequente formação de bolhas de oxigénio. Usada para distinguir o género *Staphylococcus* spp (catalase positiva) de *Streptococcus* spp (catalase negativa).

- Prova da coagulase ligada: permite a distinção entre *S. aureus* dos restantes *Staphylococcus* spp, uma vez que os primeiros têm coagulase e, quando misturados com o reagente que contém anticorpos contra os polissacarídeos do *S.aureus*, aglutinam.
- Prova do indol: revela se o microrganismo possui a triptofanase, que vai degradar o triptofano com produção do indol (produto final) que ao reagir com o p-dimetil-aminocinaaldeído origina um produto corado. Importante para distinguir as Enterobacteriaceae.
- Prova das oxidases: é uma prova presuntiva de *Pseudomonas* spp.. Visa a deteção da presença da atividade do citocromo c oxidase que, quando presente vai oxidar o reagente tetrametil-p-fenilenediamino dihidrocloro, havendo mudança do mesmo para púrpura.
- Prova PYR: permite a identificação presuntiva de *Streptococcus* do grupo A dentro dos  $\beta$ -hemolíticos. Se a pirrodonil peptidase estiver presente hidrolisa a PYR e liberta a  $\beta$ -naftilamina que ao reagir com o p-dimetil-aminocinaaldeído forma um precipitado cor-de-rosa.
- Prova de sensibilidade à optoquina: diferencia o *Streptococcus pneumoniae* por inibição (halo  $\geq 14$ mm) do seu crescimento dos outros *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos onde não ocorre inibição.
- Prova da bacitracina: diferencia os *Streptococcus* do grupo A (sensíveis, halo  $\geq 15$ mm) dos restantes *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos (resistentes).
- Prova da Novobiocina: diferencia os *Staphylococcus* coagulase negativa (sensível, halo  $\geq 12$ mm) do *Staphylococcus saprophyticus* (resistente).
- Prova da urease: distingue espécies produtoras de urease como por exemplo, o *Proteus* spp. e a *Klebsiella pneumoniae*, de espécies não produtoras. A ureia contida no meio é convertida em amoníaco e, como há libertação de amina o meio muda de cor.

Como provas de identificação manual ainda existem as galerias de identificação, API's, mas que estão a cair em desuso devido à existência de métodos automatizados que permitem uma identificação mais rápida.

### **Identificação automática**

Como sistemas de identificação automática o serviço possui o VITEK MS e o VITEK 2 da BioMérieux e o MicroScan Walkaway 40 plus da Siemens.

O VITEK MS é um sistema de espectrometria de massa idealizado para identificação de bactérias e fungo de uma forma rápida, com resultados precisos e confiáveis. Este sistema vai permitir a ionização das proteínas bacterianas e detetá-las, gerando um espectro representativo das proteínas de cada amostra. Estes espectros são posteriormente comparados com uma base de dados, emitindo o resultado da identificação em termos de similaridade face ao armazenado nessa base.

O VITEK 2 usa cartas com provas bioquímicas para a sua identificação que após inoculadas pelo sistema as lê por fluorimetria, ou seja, lê a fluorescência de cada uma das características e compara-as numa base de dados, sendo aqui também o resultado dado em termos de similaridade (20).

O MicroScan Walkaway 40 Plus da Siemens é o equipamento que identifica bactérias não fermentadoras por colorimetria e fluorometria, sendo usado no serviço apenas para a identificação de *Pseudomonas* spp..

### **Testes de suscetibilidade**

Os testes de suscetibilidade são estudos que permitem averiguar a sensibilidade ou resistência de uma estirpe face aos antibióticos. Estes testes podem ser feitos por métodos de difusão em disco e E-test, ou métodos automatizados.

Devem ser efetuados quando um microrganismo é responsável por uma infeção e seja necessário instituir uma terapêutica, sempre que um microrganismo seja isolado em produtos considerados estéreis e para estudos de avaliação de resistências.

A técnica de Kirby-Bauer (método de difusão) consiste na inoculação de uma gelose Muller-Hinton (MHE), a partir de uma suspensão de 0.5McFarland, incubada com discos ou tiras de E-test impregnados de antibiótico, permitindo a formação de halos ou elipses de inibição, respetivamente. Estes halos e elipses seguem as normas do EUCAST, que determina as CMI's (quantitativo) ou pela determinação qualitativa (sensível, intermédio ou resistente).

O Vitek 2<sup>®</sup> é um sistema automatizado que utiliza cartas de suscetibilidade para bactérias (AST-P586, AST-P619, AST-N192, YST e NH); onde todas implicam uma solução com 0.5 McFarland com exceção da carta de NH onde a turvação varia entre 2.2-2.8

McFarland) e para fungos (YST, com uma turvação de 1.8 a 2.2 na escala de McFarland) com intuito de avaliar a sensibilidade ou resistência aos antimicrobianos. Também o Vitek 2® usa como base a classificação nas CMI's.

O MicroScan Walkaway 40 plus da Siemens também realiza testes de suscetibilidade usando a mesma metodologia.

No CHP, por norma, todos os testes de suscetibilidade são realizados no Vitek 2® com exceção dos testes de suscetibilidade ao *Streptococcus pneumonia*, *Acinetobacter* spp., *Haemophilus* spp. e *Corynebacterium* spp. que, se efetuam por métodos manuais devido à pouca sensibilidade dos equipamentos, os testes de *Mycobacterium* spp. que são realizados por biologia molecular e no MGIT,

## **Controlo de qualidade**

O controlo da qualidade é feito pelo controlo interno realizado com estirpes ATCC, e o controlo externo, ao cargo duma instituição independente, UK-NEQAS, que periodicamente envia amostras liofilizadas de vários produtos biológicos acompanhados de uma breve história clínica. O controlo externo é uma mais-valia laboratorial não só pelo grau de exigência, mas também, pela variedade de microrganismos enviados que muitas vezes não são tão comuns na rotina laboratorial.

## Conclusão

O estágio curricular assente no plano de estudos do Mestrado de Análises Clínicas permitiu-me ter outro contacto com o laboratório bem diferente do que já tinha experienciado, não só pelo volume como especificidade das amostras, pelo ritmo extenuante de trabalho bem como uma realidade que até à bem pouco desconhecia: ser trabalhador. Apesar da curta duração do estágio realizado em cada setor foi, ainda assim, possível inteirar-me da rotina laboratorial e assim sentir o que é ser trabalhador num grande centro hospitalar.

Este estágio permitiu a consolidação de conhecimentos lecionados durante o 1º ano letivo e graças à especificação dos serviços, ganhar novos conhecimentos. Também o contacto com os diferentes profissionais de saúde torna-se importante para a minha formação enquanto pessoa, não só pela vasta experiência que possuem mas também ajudam-nos a descumprir em alturas de maior *stress*.

Depois de acabada mais uma etapa da minha vida e após andar um ano letivo a questionar-me se teria feito a melhor escolha ao apostar neste mestrado, hoje posso afirmar que não poderia ter escolhido melhor e que as ansias e os medos deram lugar a confiança.





## Bibliografia

- (1) HOFFBRAND, A. V., MOSS, P.A.H., PETTIT, J.E. – **Fundamentos em Hematologia**. 5ªEd. Porto Alegre: Artemed, 2008. ISBN 978-85-363-1106-7
- (2) BURTIS, Carl A. *et al.* – **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry**. 6ª Ed. St. Louis: Elsevier, 2008. ISBN: 978-0-7216-3865-2
- (3) BRAIN, Barbara J. *et al.* – **Dacie and Lewis Practical Haematology**. 11ªEd.: Elsevier, 2011. ISBN 978-0-7020-3408-4
- (4) ORKIN, S. *et al.* – **Hematology of Infance and Childhood**. 7ª ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2009. ISBN: 978-1-4160-3480-8
- (5) JOUTOVSKY, A., HADZI-NESIC, J., NARDI, M.A.. – **HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: a study of 60000 samples in a clinical diagnostic laboratory**. Clin Chem, 2004, Oct. 50(10): p. 1736-1747.
- (6) MURRAY, P., ROSENTHAL, K., PFALLER, M. – **Medical Microbiology**. 7th Ed. Elsevier, 2012. ISBN: 978-0-323-08692-9
- (7) TILLE, Patricia – **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 13th Ed. St.Louis: Elsvier. 2014. ISBN: 978-0-323-08330-0
- (8) IMAN, Talha H. – **Bacterial Urinary Tract Infection**. Mercj Manual, 2013. [Acedido a 23 de Abril de 2015]. Disponível na Internet: <https://www.merckmanuals.com/professional/genitourinary-disorders/urinary-tract-infections-uti/bacterial-urinary-tract-infections>
- (9) HOVELIUS B, MÅRDH PA. – **Staphylococcus saprophyticus as a common cause of urinary tract infections**. Rev Infect Dis. 1984 May-Jun;6(3):328-37.
- (10) AREAL, Alexandra *et al.* – **Infeção perinatal por Streptococcus agalactiae pode ser evitada: Prevalência da colonização em parturientes no Hospital São Marcos, fatores de risco e a sua relação com a infeção perinatal**. Acta Pediatr Port. 2010. 41(1): p. 16-21.
- (11) MAHON, Connie R. *et al.* – **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 4<sup>th</sup> Ed. Elsvier. 2011. ISBN: 978-0-323-08989-0.
- (12) BOECKH, M., BOIVIN, G. – **Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Applications**. Clin Microbiol Rev. 1998.11(3): p. 533-554.

- (13) KOUSHA, M., TADI, R., SOUBANI, A.O. – **Pulmonary aspergillosis: a clinical review**. Eur Respir Rev. 2011. 20(121): p. 156-74.
- (14) Ministério da Saúde – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. **Programa Nacional de Controlo da Infecção. Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia**. Programa Nacional de Controlo da Infecção, Observatório Nacional da Saúde. 2004.
- (15) MURPHY, T.F., PARAMESWARAN, G.I. – **Moraxella catarrhalis, a Human Respiratory Tract Pathogen**. Clin Infect Dis. 2009. 49(1): p. 124-131
- (16) HANNA, Bruce A. *et al.* – **Multicenter Evaluation of the BACTEC MGIT 960 System for Recovery of Mycobacteria**. J Clin Microbiol. 1999 Mar; 37(3): p. 748-752.
- (17) BOEHME, Catharina C. *et al.* – **Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance**. N Engl J Med. 2010. 11(363): p. 1005-1015.
- (18) 12. SURENDRAN, Sankar – **Rotavirus Infection: Molecular Changes And Pathophysiology**. Excli Journal. 2008. 7: p. 154-162.
- (19) CIRAK, M.Y., AKYÖN, Y., MÉGRAUD, F. – **Diagnosis of Helicobacter pylori**. Besevier: Faculdade de Medicina, 2007. [Acedido a 14 de Maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://faculty.vet.upenn.edu/gastro/documents/Helicobacterdiagnosisofhelicobacterpylori.pdf>
- (20) LIGOZZI, M., *et al.* – **Evaluation of the VITEK 2 System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Medically Relevant Gram-Positive Cocci**. J Clin Microbiol. 2002; 40(5): p.1681-1686.